



- (21) 申請案號：103108912 (22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 13 日
- (51) Int. Cl. : *C07D487/04 (2006.01)* *A61K31/519 (2006.01)*
A61P11/06 (2006.01)
- (30) 優先權：2013/03/15 歐洲專利局 13275070.4
 2013/11/18 歐洲專利局 13193372.3
- (71) 申請人：瑞斯比維特有限公司 (英國) RESPIVERT LIMITED (GB)
 英國
- (72) 發明人：布洛克斯 魯迪 BROECKX, RUDY LAURENT MARIA (BE)；寇普曼斯 艾力克斯 COPMANS, ALEX HERMAN (BE)；史密斯 艾隆 SMITH, ALUN JOHN (GB)；塔岱 大衛 TADDEI, DAVID MICHEL ADRIEN (FR)；歐尼恩斯 史都特 ONIONS, STUART THOMAS (GB)
- (74) 代理人：林秋琴；陳彥希
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：17 共 96 頁

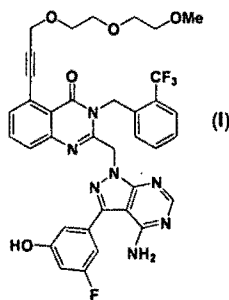
(54) 名稱

化合物

COMPOUND

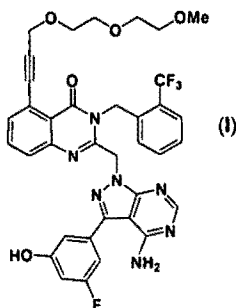
(57) 摘要

本發明特別係關於式(I)化合物



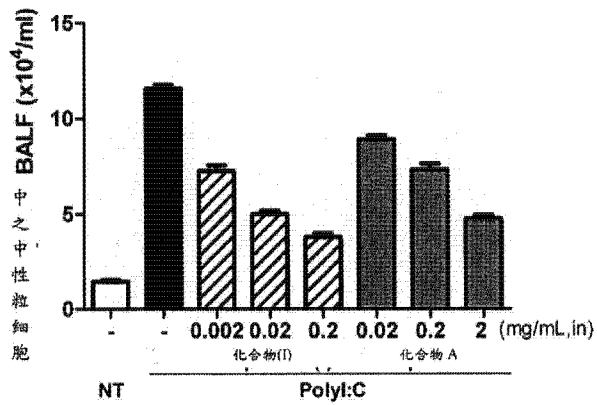
及關於包括其等之組成物及關於該化合物及該化合物之組成物於治療，例如治療發炎疾病，特別是呼吸道發炎疾病的用途。本發明亦延伸至製備該化合物的方法。

The present invention relates inter alia to a compound of formula (I)

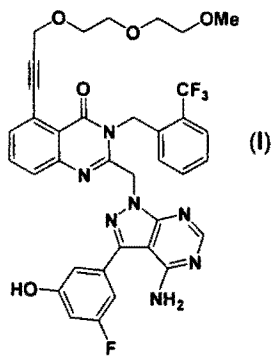


and to compositions comprising the same and to the use of the compounds and to compositions of the compounds in treatment, for example in the treatment of inflammatory diseases, in particular respiratory inflammatory disease. The invention also extends to methods of making the said compounds.

圖式 1a: 用化合物(I)或化合物 A 於老鼠呼吸道對於聚-I: C-誘發之中性粒細胞累積的治療功效



NT: 未處理, in: 鼻內



發明摘要

※ 申請案號：103108912

※ 申請日：※IPC 分類：
107.3.13

C07D487/04 (2006.01)

A61K31/519 (2006.01)

A61P11/06 (2006.01)

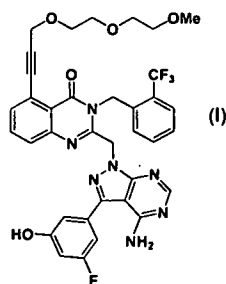
【發明名稱】(中文/英文)

化合物

COMPOUND

【中文】

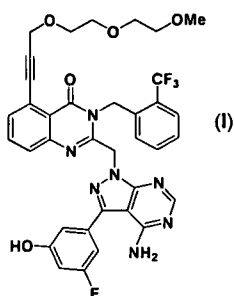
本發明特別係關於式(I)化合物



及關於包括其等之組成物及關於該化合物及該化合物之組成物於治療，例如治療發炎疾病，特別是呼吸道發炎疾病的用途。本發明亦延伸至製備該化合物的方法。

【英文】

The present invention relates inter alia to a compound of formula (I)



and to compositions comprising the same and to the use of the compounds and to compositions of the compounds in treatment, for example in the treatment of inflammatory diseases, in particular respiratory inflammatory disease. The invention also extends to methods of making the said compounds.

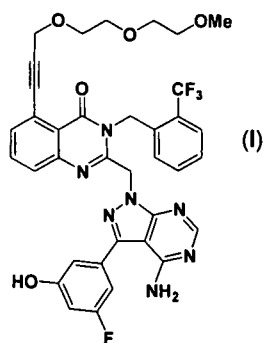
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1a ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

化合物

COMPOUND

【技術領域】

本發明範疇

【0001】 本發明係關於抑制磷酸肌醇 3-激酶，(PI3 激酶，PI3K) 之化合物。特別的，所揭示者為抑制 PI3K δ 亞型及，此外，其 γ 亞型之化合物，及關於其等於治療，包括於製藥組合中，尤其是於治療發炎疾病，包括肺的發炎疾病，如 COPD 及氣喘的用途。本發明亦延伸至製備該化合物及包含其等之製藥組成物。

【先前技術】

本發明之背景

【0002】 脂肪激酶係催化脂肪之磷酸化作用而產生涉及大範圍生理過程，包括細胞遷移及黏附，之調節的種類。該 PI3 激酶 (PI3K) 為與蛋白質有關之膜且屬於能催化脂質磷酸化作用之酵素屬，其等本身與細胞膜相關。該 PI3K δ 同工酶(PI3K δ)乃負責產生各種 3'-磷酸化磷酸肌醇之四種型式 I PI3K 激酶之等形之一種，其傳介細胞信號傳導且牽連於發炎，生長因子信號傳導，惡性腫瘤轉型及免疫力[參見 Review by Rameh, L. E.及 Cantley, L. C.J. Biol. Chem., 1999, 274: 8347-8350]。

【0003】 涉及在控制發炎之 PI3K 業於諸多型式中使用泛-活性 PI3K 抑制劑，如 LY-294002 及 Wortmannin [Ito, K.等, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 2007, 321: 1-8.]中確認。近年來之研究係使用如下所述選擇性 PI3K 抑制劑或於缺乏特定酶等形之擊倒小鼠來進行。此等研究證明了於發炎時，由 PI3K 酵素來控制呼吸道之角色。經發現於卵白蛋白-致敏，卵白蛋白-挑戰小鼠，PI3K δ 選擇性抑制劑 IC-87114 抑制呼吸道高反應性，IgE 釋放，促炎性細胞因子的表達，發炎細胞聚集至肺部及血管通透性[Lee, K. S.等, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, 118: 403-409 及 Lee, K. S.等, *FASEB J.*, 2006, 20: 455-65]。此外，IC-87114 藉由 TNF α 刺激降低小鼠肺中之中性粒細胞聚集及中性粒細胞功能[Sadhu, C.等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 308: 764-9]。

【0004】 該 PI3K δ 等形(isoform)係藉由胰島素及其他生長因子，以及藉由偶合蛋白質信號及炎性細胞因子之 G-蛋白質來活化。再者，使用擊倒小鼠的研究顯示 PI3K γ (PI3K γ)之活化於氣喘之發病機制可能是重要的。例如，鼠肥大細胞反應係於試管內及生體內藉由需要功能性 PI3K γ 之自分泌信號而加劇。缺乏 PI3K γ 之小鼠於挑戰以被動全身過敏時不會出現水腫[Wymann M.P.等, *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, 31: 275-80.]。因此，PI3K γ 係經由各種 G-蛋白質偶合受體(GPCRs)，尤其是藉由控制肥大細胞功能而接轉發炎信號。亦報導在卵白蛋白致敏和激發之小鼠中嗜酸性粒細胞之聚集亦於此等 PI3K γ -缺乏小鼠中被抑制，如與野生型動物相較[Lim D.H.等, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2009, 296(2): L210-L219]。最後，用 PI3K γ 抑制劑之治療法衰減了 IL-13-所增

強之肺葉呼吸道收縮[Jiang H.等，J. Pharmacol. Exp. Ther.，2012，342(2)：305-11]。

【0005】 最近，PI3K 雙 δ/γ 抑制劑 TG100-115 被報導可在小鼠模式中抑制肺嗜酸細胞增多症並降低白介素-13 濃度，黏蛋白堆積及呼吸道高反應性，當藉由氣溶膠給藥時。相同作者亦報導該化合物可抑制藉由 LPS 或香煙煙霧所引起之肺部中性粒細胞[Doukas，J.等，J Pharmacol. Exp. Ther.，2009，328：758-765.]。據報導，當與 PI3K δ 選擇性抑制劑相較時，其他 PI3K δ 及 γ 之小分子抑制劑可產生對於 LPS 引起之 TNF α 生成及 T 細胞活化的優異抑制作用 [Williams O.等，Chem Biol.，2010，17(2)：123-34]。

【0006】 由於其亦可藉由氧化性應激反應來活化，該 PI3K δ 等形可能是於該等疾病上以治療性干預之目標而相關，其中涉及高層次的氧化應激反應。PI3K 信號傳導途徑之下游媒介子包括 Akt (絲胺酸/蘇胺酸蛋白質激酶)及哺乳動物雷帕黴素靶，酶 mTOR。最近之作業提示 PI3K δ 之活化作用，導致 Akt 之磷酸化，另於皮質類固醇激素敏感的細胞能誘導皮質類固醇激素狀態[To，Y.等，Am. J. Respir. Crit. Care Med.，2010，182：897-904.]。這些觀察結果導致這一假設，此信號級聯可為一負責於罹患 COPD 之患者肺部觀察到之發炎的皮質類固醇不敏感性，以及於該等因抽煙之哮喘的機制，因而致使他們的肺部遭到提高的氧化應激反應。真的，茶鹼，用來治療 COPD 及氣喘兩者之化合物，業被建議經由涉及藉由 PI3 激酶 δ 來控制之途徑之交互作用的機制而扭轉類固醇不敏感性[To，Y.等，Am. J. Respir. Crit. Care Med.，2010，182：897-904.]。

【0007】 現今，氣喘及 COPD 兩者之治療主體為吸入療法，使用皮質類固醇，毒蕈鹼拮抗劑及 β_2 -激動劑之組合，作為臨床上適用的判斷。於 COPD 及氣喘上，解決未滿足之醫療需求的一個方式乃確定新的吸入藥物，當用於單一治療或於與一種或多種來自此三種藥理類別之醫藥品之組合中時，其有可能提供顯著的優點。因此，仍有需要確定及開發等形選擇性 PI3K 抑制劑，其對於氣喘，COPD 及其他發炎疾病有可能提供增強的治療功效。

【0008】 WO 2012/052753 係揭示：6-(2-((4-胺基-3-(3-羥基苯基)-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-3-(2-氯苄基)-4-酮基-3,4-二氫喹啉-5-基)-N,N-聯(2-甲氧基乙基)己-5-炔醯胺，於本文中係指稱為已知技藝化合物 A。

【0009】 WO 2011/048111 係揭示特定之 3-苄基-5-炔基-喹啉-4(3H)-酮。

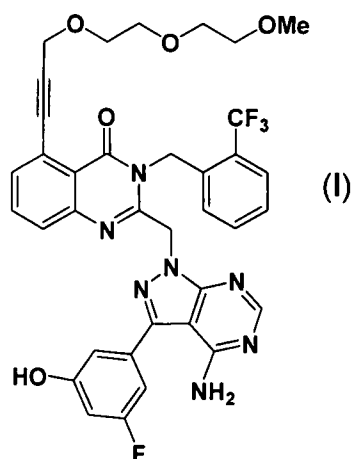
【0010】 本文中揭示之一化合物實例為 2-((4-胺基-3-(3-羥基苯基)-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-3-(2-氟苄基)-5-(3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔基)喹啉-4(3H)-酮，於本文中指稱為實例 50。

【0011】 這些已知技藝之化合物無一具有與本文中揭示之式(I)化合物相同之有利表現。

【發明內容】

本發明摘要

【0012】 根據本發明，係提供式(I)化合物：



或其製藥上可接受之鹽，包括其所有的立體異構物，互變異構體及同位素衍生物。

【0013】 於本發明另一方面，係提供呈固態結晶型式之式(I)化合物。

【0014】 再於本發明另一方面，係提供呈其型式 2 多晶型結晶之型式的式(I)化合物(有時於本文中係指稱為“型式 2 多晶型結晶”)。

【0015】 再於本發明另一方面，係提供呈其型式 3 多晶型結晶之型式的式(I)化合物(有時於本文中係指稱為“型式 3 多晶型結晶”)。

【0016】 已知技藝化合物 A 及與本案揭示之實例 50 化合物之試管內表現的比較係呈現於下文中(參見實驗章節之表 5)。本發明化合物為特別有效的雙 PI3K δ/γ 等形抑制劑，此藥理特性，其較先前揭示之化合物賦予其一個獨特且有利的治療表現。本發明之此方面特別係於式(I)化合物於動物模式之生體內表現得證，其等為

係於肺部發炎之治療功效及臨床功效的預測因子（參見實驗章節之表 8-12）。

【0017】 於一個具體例中，本案揭示之化合物較已知技藝化合物具有改進的抑制活性，當於生體內比較測試物質抑制聚 IC 引起之嗜中性粒細胞流入小鼠肺部之能力的分析。該得證之改良與先前於技藝中揭示之已知化合物相較為 1，2，3，4，5，6，7，8，9 或 10 倍(或更多)。

【0018】 生體內聚 IC 分析之活性被認為是本發明化合物於罹患氣喘或 COPD 之患者中抑制病毒誘發之病情加重之潛力的指標。它被認為，病毒感染所引起之疾病的加重係藉由日益惡化於病患肺部之發炎及藉由產生激素耐藥型表型。聚 IC 刺激了其中的一個機制，經由其，病毒係促炎性。

【0019】 本文中說明之化合物的類藥性質，包括其固有的物理及化學穩定性，溶解度表現，且尤其是其獨特的生物活性使得該化合物特別適用作為藥劑且特別為治療發炎所傳介之疾病。

本發明之詳細說明

【0020】 本文中所使用之抑制劑一詞意指一化合物，於試管內酶分析時降低(例如由至少 10%，20%，30%，40%，50%或更多)或消除目標蛋白質，例如 PI3K δ 同工酶，之生物活性。

【0021】 本文中所使用之 δ/γ 抑制劑一詞意指化合物抑制，至某種程度，對於兩者酶等形之抑制活性事實，儘管不是必須，係到相同程度。

【0022】 本案揭示之化合物於細胞基底之篩選系統為具有活性且因此證明其具有適當特性以穿透細胞且能發揮細胞內藥理功效

(參見實驗章節之表 6 及表 7)。

【0023】 本案揭示之化合物具有治療相關及想要的製藥特性的醫藥品，例如物-化特徵包括足夠的化學及光穩定性，適當的溶解度表現及強力活性。

【0024】 於一個具體例中，其係提供本發明化合物之製藥上可接受的鹽。

【0025】 於一個具體例中，其係提供本發明化合物之製藥上可接受的酸加成鹽。

【0026】 前文中，該製藥上可接受的酸加成鹽意指包括治療活性，無毒性，該式(I)化合物可形成之酸加成鹽。這些製藥上可接受的酸加成鹽類可容易的藉由將該游離鹼型式之式(I)化合物用例如此等適當酸來處理而得到。適當酸之實例包括，例如，無機酸如氫氯酸，氫溴酸，及硫酸，及磷酸等；或有機酸如，例如，醋酸，丙酸，羥基醋酸，乳酸，丙二酸，琥珀酸，順式丁烯二酸，反式丁烯二酸，馬來酸，酒石酸，檸檬酸，甲烷磺酸，對甲苯磺酸，環己氨磺酸，水楊酸，對胺基水楊酸，雙羥萘酸等。另一個適當酸之實例為苯磺酸。

【0027】 式(I)化合物之鹽的實例包括所有製藥上可接受的鹽，如，但不限於，無機酸之酸加成鹽如 HCl 及 HBr 鹽及有機酸之加成鹽如甲烷磺酸鹽。其他實例包括硫酸鹽及磷酸鹽。

【0028】 於另一個具體例中，其係提供本發明化合物之製藥上可接受的鹽，其係藉由將式(I)化合物與適當鹼進行反應而形成。適當鹼之實例包括，例如氫氧化鈉，氫氧化鉀，氫氧化鎂，氫氧化鈣，L-精胺酸，膽鹼及 L-離胺酸。

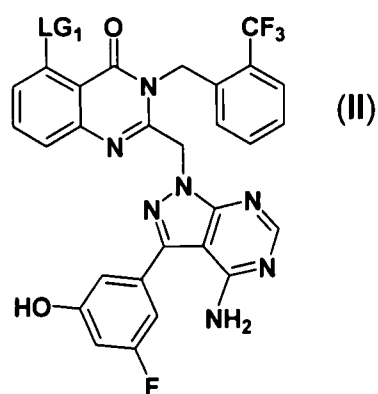
【0029】 於一個具體例中，其係提供 2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苯基)-1H-吡唑並[3,4-d]嘓啶-1-基)甲基)-5-(3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔-1-基)-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮作為游離鹼。

【0030】 本發明亦延伸至本文中揭示之化合物的溶劑合物。溶劑合物之實例包括水合物。

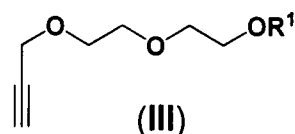
【0031】 本案化合物包括那些其中指定之原子為天然生成或非天然生成之同位素。於一個具體例中，該同位素為一穩定的同位素。因此，本案化合物包括，例如那些含有一種或多種氘原子以代替氫原子等者。

【0032】 所揭示者係延伸至所有本文中所定義之化合物的多晶型型式。

【0033】 該式(I)化合物可方便地藉由一製法而製備，其係將式(II)化合物：



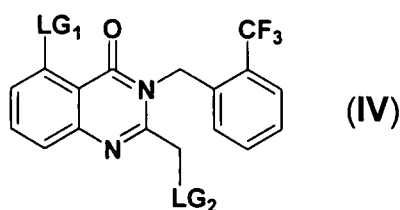
或其經保護之衍生物，其中，LG₁ 代表一釋離基，如鹵素，特別為溴，與式(III)化合物：



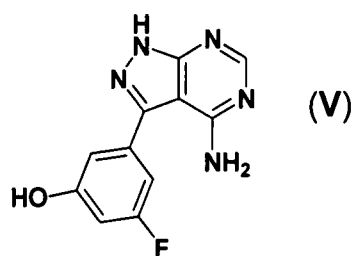
於適當催化劑及有機鹼存在之下及於極性對質子為惰性之溶劑中於惰性氛圍中進行反應。適當催化劑包括鈀催化劑，如聯(三苯基膦)鈀(II)二氯化物，於碘化銅存在之下。此轉化中適當的極性對質子為惰性之溶劑為 DMF 且適當的惰性氛圍為氮氣。

【0034】 於其中式(II)化合物為經保護之衍生物之合成製法中，該式(I)化合物係藉由適當的去保護步驟而揭露，如於技藝中所詳知及實施。例如，當式(I)化合物中之苯酚係被矽烷基基團所保護，例如用第三丁基二甲基矽烷基基團，該去保護步驟可藉由用試劑如四丁基銨氟化物於極性對質子為惰性之溶劑如 DMF 存在之下處理而生效。該反應可於降低之溫度，如於 0 °C 時進行。

【0035】 式(II)化合物可藉由將式(IV)化合物：



或其經保護之衍生物，其中，LG1 代表定義如上式(II)化合物之釋離基，且 LG2 亦為一釋離基如鹵素，例如一鹵素原子及適當的氯，與式(V)化合物：

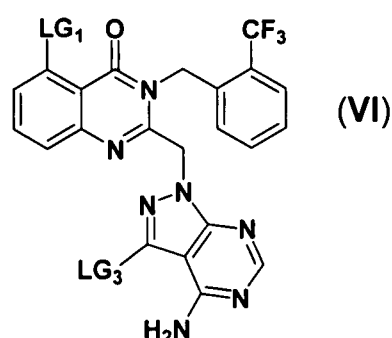


或其經保護之衍生物，在一鹼存在之下及於極性對質子為惰性之溶劑中，進行反應而製備。

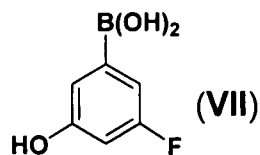
【0036】 此轉化反應之適當鹼包括碳酸鉀且適當極性對質子為惰性之溶劑為 DMF。

【0037】 合成之製法包括那些被認為於偶合步驟中保護式(VII)化合物之苯酚羥基有利者且適當的經保護之衍生物包括第三丁基二甲基矽烷基醚及第三丁基醚。

【0038】 替代的，式(II)化合物可藉由將式(VI)化合物：



或其經保護之衍生物，其中， LG_1 ，係定義如上之式(II)化合物中且 LG_3 代表一釋離基如鹵素，特別為碘，與式(VII)化合物：



或其經保護之衍生物，於適當貴金屬催化劑存在下，一無機鹼及於一極性對質子為惰性之溶劑中，於惰性氛圍中進行反應；接著，

如果適當，藉由去保護反應而製備。

【0039】 適當的催化劑為四(三苯基膦)鈀(0)。

【0040】 適當的無機鹼為碳酸鈉且適當的極性對質子為惰性之溶劑為乙醇。

【0041】 該反應可在上昇之溫度時進行，例如於 85 °C 達一延伸期間，例如，於冷卻至室溫之前 3 天。

【0042】 保護基可有利的於上述說明之一種或多種反應順序期間遮蓋化學性敏感基團，以確保製法中之一種或多種生效。因此如果想要或需要，中間體化合物可藉由習用保護基來保護。移除所需之保護基及方法係於“Protective Groups in Organic Synthesis”，由 Theodora W. Greene 及 Peter G.M. Wuts 說明，由 John Wiley & Sons Inc；4th Rev Ed.，2006，ISBN-10：0471697540 公開。

【0043】 新穎中間體係列入申請專利範圍中作為本發明之一方面。

【0044】 有利的是，本發明化合物(I)不具有阻轉異構型。

【0045】 根據本案之實例 2 所製備之化合物(I)係以型式 1 多晶型結晶製得。該型式 1 多晶型結晶的特徵在於實質上顯示於圖式 3 之 XRPD 圖示。

【0046】 型式 1 多晶型結晶樣品之熱特性被認為是複雜的。如於實例 2 中討論及顯示於圖式 4 以 DSC 分析所說明(下方圖)，型式 1 多晶型結晶樣品於加熱時經歷多次活動，且最終轉化為不同的多晶型結晶 - 本文中指稱為型式 2 多晶型結晶。

【0047】 經發現該型式 2 多晶型結晶為無水且於約 190 °C(波峰)熔融分解。於型式 1 多晶型結晶所進行之漿化實驗造成由大部分

溶劑中形成型式 2 多晶型結晶，即便是無水多晶型結晶-本文中指稱為型式 3 多晶型結晶，係藉由將型式 1 多晶型結晶於二氯甲烷中漿化而得到。經發現型式 3 多晶型結晶為無水且於約 186 °C(波峰；參見實例 8)時熔融分解。數種化合物(I)之假多晶型(型式 4, 5, 6 及 7 假多晶型)亦藉由於 THF, 1,4-二噁烷, 10% 水/乙腈或 10% 水/丙酮中漿化無定形式之型式 1 多晶型結晶或化合物(I)而得到(參見實例 9 至 12)。

【0048】 於七種不同多晶型及假多晶型型式之化合物(I)中，型式 2 及型式 3 多晶型結晶為最有前景的固體狀態屬性，而型式 2 多晶型結晶由於具有較高的熔點而屬最有利。

【0049】 競爭性漿化實驗係於各種溶劑中在各種溫度時於型式 2 及型式 3 多晶型結晶之 50: 50 混合物中進行(參見實例 13)。所有生成型式 2 多晶型結晶之實驗，證實此乃熱力學上更穩定的型式。鑑於最好是將多晶型型式相互-轉化的風險最小化，於儲存化合物及製備含有化合物之製藥產物，或於製備後此等產物之壽命期間，該型式 2 多晶型結晶較型式 3 多晶型結晶及其他化合物(I)之多晶型型式為有利。

【0050】 適當的，型式 2 多晶型結晶係藉由將化合物(I)由溶液中於 1-丙醇中結晶出來而製備。使用 1-丙醇之示範性程序係說明於實例 3，有或無接種。

【0051】 該型式 2 多晶型結晶亦可藉由將型式 1 多晶型結晶於甲醇，乙醇，2-丙醇，1-丙醇，丙酮，醋酸乙酯，乙腈，甲苯，異丙基醋酸酯，TBME，2-丁酮，DMSO，二乙醚，MIBK，庚烷，硝基甲烷，10%水/乙醇，10%水/乙腈或 10%水/2-丙醇中漿化而製備。

【0052】 替代的，該型式 2 多晶型結晶可藉由將化合物(I)於甲醇，乙醇，2-丙醇，1-丙醇，丙酮，醋酸乙酯，乙腈，甲苯，異丙基醋酸酯，TBME，2-丁酮，DMSO，二乙醚，MIBK，硝基甲烷，10%水/乙醇或 10%水/2-丙醇中漿化成無定形型式而製備。

【0053】 本案發明人的實驗顯示漿化呈無定形型式之化合物(I)，於二氯甲烷，導致形成型式 3 多晶型結晶。因此，應避免使用意在形成型式 2 多晶型結晶之於結晶條件下的二氯甲烷。

【0054】 本案發明人的實驗顯示，漿化呈無定形型式之化合物(I)或型式 1 多晶型結晶，於 THF，導致形成型式 4 假多晶型。因此，應避免使用意在形成型式 2 多晶型結晶之於結晶條件下的 THF。

【0055】 本案發明人的實驗顯示漿化呈無定形型式之化合物(I)或型式 1 多晶型結晶，於 1,4-二噁烷，導致形成型式 5 假多晶型。因此，應避免使用意在形成型式 2 多晶型結晶之於結晶條件下的 1,4-二噁烷。

【0056】 本案發明人的實驗顯示，漿化呈無定形型式之化合物(I)，於 10%水/乙腈，導致形成型式 6 假多晶型。因此，應避免使用意在形成型式 2 多晶型結晶之於結晶條件下的 10%水/乙腈。

【0057】 本案發明人的實驗顯示漿化呈無定形型式之化合物(I)，於 10% 水/丙酮中，導致形成型式 7 假多晶型。因此，應避免使用意在形成型式 2 多晶型結晶之於結晶條件下的 10%水/丙酮。

【0058】 該型式 2 多晶型結晶之特點在於實質上顯示於圖式 5 之 XRPD 圖示。此圖顯示於位置 8.2，9.0，9.2，9.7，12.2，14.1，14.3，15.0，16.4，18.0，18.5，19.0，19.6，21.8，22.3，22.5，24.3，24.5，24.8，25.1 及 25.8 具有主要峰值($\pm 0.2^\circ$ ，2- θ 值)。典型的，至少 3

個(例如 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 或所有 21 個)這些峰值可在產生的 XRPD 圖示上觀察到。於 9.7, 12.2, 14.1 及 14.3 之峰值為型式 2 多晶型結晶之特別的特徵且因此, 其典型的至少這些峰值之 1 個(例如 1, 2, 3, 或所有 4 個)可在 XRPD 圖示上觀察到。

【0059】 該型式 3 多晶型結晶之特點在於實質上顯示於圖式 12 之 XRPD 圖示。

【0060】 該型式 4 假多晶型之特點在於實質上顯示於圖式 17 之 XRPD 圖示。

【0061】 該型式 5 假多晶型之特點在於實質上顯示於圖式 17 之 XRPD 圖示。

【0062】 該型式 6 假多晶型之特點在於實質上顯示於圖式 17 之 XRPD 圖示。

【0063】 該型式 7 假多晶型之特點在於實質上顯示於圖式 17 之 XRPD 圖示。

【0064】 於一方面, 該化合物有用於治療, 例如 COPD 及/或氣喘。

【0065】 該發展迄今之 PI3K 化合物典型的被用於口服給藥。典型的, 此一策略涉及化合物之藥物動力學表現的最優化以便達到適當的作用期間。依此方式, 建立足夠高的藥物濃度並於劑量間維持以提供連續的臨床利益。此方法之一必然且經常不想要的結果是未靶向人體組織, 尤其是其肺部及腸道, 很可能被暴露在藥物的藥理學活性濃度中。

【0066】 一種替代的策略是設計治療方案, 其中藥物係被直接給

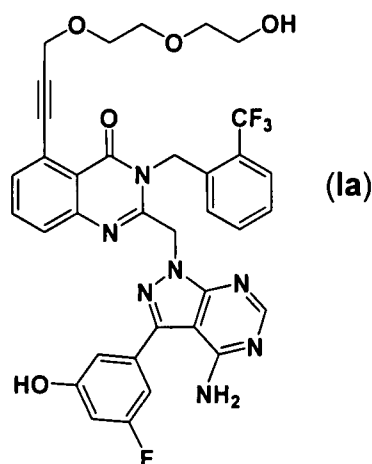
藥至發炎的器官(例如局部治療)。雖然此方法並不適用於治療所有慢性發炎情況，其已被廣泛地應用在治療肺部疾病(氣喘，COPD，囊性纖維化)，皮膚損傷(異位性皮膚炎及牛皮癬)，鼻部疾病(過敏性鼻炎)，眼睛疾病(過敏性結膜炎)及胃腸功能障礙(潰瘍性結腸炎)。

【0067】 於局部療法時，想要的功效有時可藉由確定該藥物具有作用的持續期間且主要保留在靶器官而達到，因而將全身毒性的風險最小化。替代的，可使用一適當製劑，其產生活性藥物之“儲存槽”，然後其可維持所希望的效果。舉例說明之第一個方法係抗膽鹼能藥物噻托溴銨(Spiriva HandiHaler[®])之用途，其係局部給藥至肺部如處理 COPD。此化合物對於其靶受體具有異常高的高親和力，造成非常慢的降率(解離速率)及隨之而來的作用持續期間。

【0068】 根據本案揭示之一方面，其等係提供式(I)化合物或含其之製藥製劑，作為 PI3 激酶抑制劑，例如局部給藥至肺部的用途。

【0069】 因此於一個具體例中，本案揭示之化合物係為了局部使用給藥至肺部以便將對於病患之治療效果最大化同時將不想要的全身作用可能性最小化。因此有利的是，式(I)化合物係快速的代謝一旦其達到一般循環，且該轉變成之產物較母分子為不具活性。

【0070】 一個可能之式(I)化合物之首過代謝的主要產物為相關醇，化合物(Ia)，其將源自 O-去甲基反應，一代謝過程，其為此種化學類型的共同特徵。此可能的代謝產物較於 α 及 β 亞型兩者中作為 PI3K 抑制劑之式(I)化合物顯著的活性較低(參見實驗章節之表 6)。



【0071】 因此，於一方面，係提供式(Ia)化合物或其製藥上可接受之鹽，包括所有立體異構物，互變異構體及其同位素衍生物。於揭示內容之一方面中，本發明化合物特別適用於局部給藥，如局部給藥至肺部，特別為治療 COPD。

【0072】 因此，於一方面，其係提供本發明化合物於治療 COPD 及/或氣喘，特別為 COPD 或嚴重氣喘，藉由吸入，即藉由局部給藥至肺部的方法。有利的是，給藥至肺部之有益作用為化合物可發揮作用同時將對於患者之副作用減到最小。

【0073】 於一個具體例中，該化合物適用於以皮質類固醇治療之敏感性患者。

【0074】 再者，本發明係提供一製藥組成物，其包括根據本案之化合物任意的與一種或多種製藥上可接受的稀釋劑或載體組合。

【0075】 稀釋劑及載體可包括那些適用於非經腸胃，口服，局部，黏膜及直腸給藥，且可能根據給藥途徑而不同。

【0076】 於一個具體例中，組成物可製備用於腸胃外，皮下，肌肉注射，靜脈注射，關節內或關節周圍給藥，特別是於液態溶液或懸浮液型式時；於口服給藥時，特別是以錠劑或膠囊型式；於

局部如肺部或鼻腔給藥時，特別是以粉末，鼻滴劑或氣溶膠及經皮給藥型式；於黏膜給藥時，如至頰，舌下或陰道黏膜，及於直腸給藥如以栓劑之型式。於另一個具體例中，組成物可製備成液體溶液或懸浮液型式以供口服給藥；製備成液體溶液，液體懸浮液，包括溶液或懸浮液之鼻滴劑或加壓或未加壓之氣溶膠以供局部給藥。

【0077】 該組成物可方便的以單位劑量型式來給藥且可藉由任何製藥技藝熟知之方法來製備，例如說明於 Remington's Pharmaceutical Sciences，第 17 版，Mack Publishing Company，Easton，PA.，(1985)。該組成物亦可方便的以複數單位劑量型式給藥。

【0078】 非經腸胃給藥之製劑可含有作為賦形劑之無菌水或食鹽水，亞烷基乙二醇，如亞丙基乙二醇，聚亞烷基乙二醇，如聚亞乙基乙二醇，植物來源的油，氫化萘等。

【0079】 經鼻給藥製劑可為固體且可含有賦形劑，例如，乳糖或葡聚醣，或可為水性或油性溶液以用於經鼻滴劑或計量噴霧型式。經鼻給藥製劑亦可呈水性懸浮液型式。對於經頰給藥時，典型的賦形劑包括糖，硬脂酸鈣，硬脂酸鎂，預凝膠化澱粉等。

【0080】 適於口服給藥之組成物可包含一種或多種生理上相容的載體及/或賦形劑且可為固體或液體型式。錠劑及膠囊可與黏結劑一起製備，例如，糖漿，阿拉伯膠，凝膠，山梨糖醇，黃耆膠，或聚乙烯吡咯烷酮；填充劑，如乳糖，蔗糖，玉米澱粉，磷酸鈣，山梨糖醇，或甘胺酸；潤滑劑，如硬脂酸鎂，滑石，聚亞乙基二醇，或矽膠；及表面活化劑，如月桂基硫酸鈉。液化組成物可含

有傳統添加劑例如懸浮劑，例如山梨糖醇糖漿，甲基纖維素，糖漿，凝膠，羧甲基纖維素，或食用油脂；乳化劑如卵磷脂，或阿拉伯膠；植物油如杏仁油，椰子油，魚肝油，或花生油；防腐劑如丁基羥基茴香醚(BHA)及二丁基羥基甲苯(BHT)。液態組成物可封裝於，例如，凝膠以提供一單位劑量型式。

【0081】 固態口服劑量型式包括錠劑，兩片式硬殼膠囊及軟彈凝膠(SEG)膠囊。此等兩片式硬殼膠囊可製自，例如，凝膠或羥基丙基甲基纖維素(HPMC)。

【0082】 一乾外殼製劑典型的包括約 40%-60%濃度之凝膠，約 20%-30%濃度之增塑劑(如甘油，山梨糖醇或亞丙基乙二醇)及約 30%-40%濃度之水。亦可存在有其他物質例如防腐劑，染料，乳濁劑及風味劑。該液體填充物質包括一固體藥物，其已溶解，溶化或分散(以懸浮劑，如蜂蠟，氫化蓖麻油或聚亞乙基乙二醇 4000)或一液體藥物於載體或載體之組合如礦物油，植物油，三酸甘油酯，乙二醇，多元醇及表面活性劑。

【0083】 適當的，該式(I)化合物係局部給藥至肺部。因此，於一個具體例中，其係提供製藥組成物，其包括本案之化合物其任意的與一種或多種局部可接受之稀釋劑或載體組合。

【0084】 局部給藥至肺部可藉由使用氣溶膠製劑而達成。氣溶膠製劑典型的包括懸浮或溶解於一適當的氣溶膠推進劑，如一氯氟碳(CFC)或氫氟碳(HFC)之活性組成份。適當的 CFC 推進劑包括三氯單氟甲烷(推進劑 11)，二氯四氟甲烷(推進劑 114)，及二氯二氟甲烷(推進劑 12)。適當的 HFC 推進劑包括四氟乙烷(HFC-134a)及七氟丙烷(HFC-227)。該推進劑典型的包括 40%-99.5%如 40%-90%

重量之總吸入性組成物。該製劑可包括賦形劑，其包含共溶劑(如乙醇)及表面活化劑(如卵磷脂，山梨醇三油酸酯等)。其他可能的賦形劑包括聚亞乙基乙二醇，聚乙烯吡咯烷酮，甘油等。氣溶膠製劑係包裝於一罐子中且藉由一計量閥而傳送出適當劑量(如由 Bepak, Valois 或 3M 或替代的藉由 Aptar, Coster 或 Vari 來提供)。

【0085】 局部給藥至肺部亦可藉由使用未加壓製劑，如水性溶液或懸浮液而達成。這些可藉由如一種可手持及可攜帶或家庭用或醫院用(即不可攜帶)之噴霧器而給藥。該製劑可包括賦形劑如水，緩衝液，張力調節劑，pH 調節劑，表面活化劑及共溶劑。懸浮液體及氣溶膠製劑(無論加壓或未加壓)將典型的含有呈細碎型式之本發明化合物，例如其 D_{50} 為 $0.5-10 \mu\text{m}$ 如約 $1-5 \mu\text{m}$ 。粒徑分佈可用 D_{10} ， D_{50} 及 D_{90} 值來代表。該粒徑分佈之 D_{50} 中間值係以微米來定義粒子大小，其將分佈分成兩半。由激光繞射所產生的測量係更準確地以體積分佈來描述，且因此，該使用此方法所得到的 D_{50} 值係更有意義的指稱為 Dv_{50} 值(體積分佈之中間值)。如本文中所使用， Dv 值係指使用激光繞射所測得之粒徑分佈。同樣的， D_{10} 及 D_{90} 值，於上下文中所使用之激光繞射法，係指 Dv_{10} 及 Dv_{90} 值且係指粒子大小，其中 10% 分佈在 D_{10} 值下方，且 90% 分佈在 D_{90} 值下方，分別的。

【0086】 局部給藥至肺部亦可藉由使用乾性粉末製劑來達成。一乾性粉末製劑將含有呈細碎型式之本案化合物，典型的具有 $1-10 \mu\text{m}$ 之質均直徑(MMAD)或 $0.5-10 \mu\text{m}$ ，如約 $1-5 \mu\text{m}$ 之 D_{50} 。呈細碎粉末型式之本發明化合物可藉由微粒化方法或類似之尺寸減低方法來製備。微粒化可藉由使用噴射研磨機來進行，如該等藉由

Hosokawa Alpine 製備者。所產生之粒子大小分佈係使用激光繞射來測量(如用 Malvern Mastersizer 2000S 儀器)。該製劑典型的將含有一局部可接受之稀釋劑,如乳糖,葡萄糖或甘露糖醇(宜為乳糖),通常為相對較大之粒子大小,如 50 μm 或更大之質均直徑(MMAD),如 100 μm 或更大,或 40-150 μm 之 D50。如本文中所使用,“乳糖”之詞係指含有乳糖之組成份,包括 α -乳糖單水合物, β -乳糖單水合物,無水 α -乳糖,無水 β -乳糖及無定形乳糖。乳糖組成份微粒化,過篩,碾磨,壓製,凝結或噴霧乾燥而製備。市售可得之各種乳糖型式亦涵蓋,例如 Lactohale[®] (inhalation grade 乳糖; DFE Pharma), InhaLac[®]70 (乾性粉末吸入劑用之過篩乳糖; Meggle), Pharmatose[®] (DFE Pharma)及 Respitose[®] (過篩吸入等級之乳糖; DFE Pharma)產物。於一個具體例中,該乳糖組成份係選自包含下列之基團: α -乳糖單水合物,無水 α -乳糖及無定形乳糖。較佳者,該乳糖為 α -乳糖單水合物。

【0087】 乾性粉末製劑亦可含有其他賦形劑,如硬脂酸鈉,硬脂酸鈣或硬脂酸鎂。

【0088】 乾性粉末製劑典型的係使用乾性粉末吸入器(DPI)裝置來傳送。乾性粉末傳輸系統之實例包括 SP 吸入器[®], DISKHALER[®], TURBOHALER[®], DISKUS[®], SKYEHALER[®], ACCUHALER[®]及 CLICKHALER[®]。乾性粉末傳送系統之其他實例包括 ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA,

ORIEL 乾性粉末吸入器，MICRODOSE，PULVINAL，EASYHALER，ULTRAHALER，TAIFUN，PULMOJET，OMNIHALER，GYROHALER，TAPER，CONIX，XCELOVAIR 及 PROHALER。

【0089】 於一個具體例中，本發明化合物係以微粒化乾粉末製劑提供，例如包括適當級別之乳糖，填充至一裝置，如 DISKUS。適當的，此一裝置為複數劑量裝置，例如該製劑係填充至泡泡中以使用於複數單位劑量裝置，如 DISKUS。

【0090】 於一個具體例中，本發明化合物係以微粒化乾性粉末製劑來提供，包括適當級別之乳糖及硬脂酸鎂，填充至供複數劑量裝置使用之硬殼膠囊泡泡中以使用於複數劑量裝置，如 DISKUS。適當的，此一裝置係一複數劑量裝置。

【0091】 於另一個具體例中，本發明化合物係以微粒化乾性粉末製劑來提供，例如包括適當級別之乳糖，填充至供單一劑量裝置使用之硬殼膠囊，如 AEROLISER。

【0092】 於另一個具體例中，本發明化合物係以微粒化乾性粉末製劑來提供，包括適當級別之乳糖及硬脂酸鎂，填充至供單一劑量裝置使用之硬殼膠囊，如 AEROLISER。

【0093】 適用於乾性粉末吸入器之化合物(I)之組成物的實例係列於實例 15。

【0094】 根據本案之化合物意圖具有治療活性。於另一方面，本發明係提供本案化合物以用作為醫藥品。

【0095】 根據本案之化合物亦可用來治療呼吸道障礙包括 COPD (包括慢性支氣管炎及肺氣腫)，氣喘，小兒氣喘，囊性纖維化，結節病，特發性肺纖維化，過敏性鼻炎，鼻炎，鼻竇炎及其任一項

病毒誘發之急性發作，呼吸道病毒感染，尤其是氣喘，慢性支氣管炎及 COPD。

【0096】 呼吸道病毒包括流感，呼吸道合胞病毒，人副流感病毒，SARS 冠狀病毒及腺病毒。呼吸道病毒之進一步實例為鼻病毒。

【0097】 本案之化合物亦可，於當先前患者的病情已變得同樣難治時，敏化患者的病情以用皮質類固醇治療。

【0098】 於本發明之一個具體例中，本案化合物所使用之一劑量係等同於適用作為單一療法但與皮質類固醇於組合中一起給藥。

【0099】 於一個具體例中，所使用式(I)化合物之劑量係作為單一試劑之亞治療，於含有皮質類固醇之組合，因而回復病患對於後者之回應，舉例說，其中該病患已對同一者成為難治。

【0100】 於一個具體例中，係使用一劑量之式(I)化合物，其係與如果於式(I)化合物不存在時給藥可為亞治療之一劑量的皮質類固醇合併在一組合中，因而回復病患對於皮質類固醇之回應，舉例說，其中該病患對同一者言已成為難治。

【0101】 此外，本案化合物可具有抗病毒活性且，例如，證明有用於治療如氣喘及/或 COPD 之發炎狀況的病毒發作。

【0102】 本案揭示之化合物亦有用於預防，治療或改善與流感病毒，鼻病毒及/或呼吸道合胞病毒有關之疾病或疾病之併發症。

【0103】 於一個具體例中，其係提供式(I)化合物以治療或預防病毒感染或病毒感染引起之發炎性併發症。

【0104】 根據本案之式(I)化合物亦預期可有用於治療某些狀況，其可藉由外用或局部治療處理，包括過敏性結膜炎，結膜炎，過敏性皮膚炎，接觸性皮膚炎，牛皮癬，潰瘍性結腸炎，類風濕性

關節炎或骨性關節炎之繼發性關節發炎。

【0105】 於一個具體例中，該式(I)化合物被認為當藉由適當途徑給藥時有用於治療C型肝炎及/或HIV。適當給藥途徑可包括口服，靜脈注射或灌注。

【0106】 於一個具體例中，該治療C型肝炎之式(I)化合物係於輸入到肝臟之前輸送到血液中。

【0107】 本案之化合物預期亦有用於治療特定之其他狀況，包括類風濕性關節炎，胰腺炎，惡病質，抑制腫瘤生長及轉移，包括非小細胞肺癌，乳癌，胃癌，大腸癌及惡性黑色素瘤。

【0108】 於一個具體例中，本案揭示之化合物及包括其等之製藥製劑有用於治療或預防癌症，特別為肺癌，尤其是藉由局部給藥至肺部。

【0109】 因此，於另一方面，本發明係提供如本文所說明之化合物以用於治療一種或多種上述狀況。

【0110】 於另一方面，本發明係提供如本文所說明之化合物以製備用於治療一種或多種上述狀況之醫藥品。

【0111】 於另一方面，本發明係提供一治療上述狀況之方法，其包括將有效量之本案化合物或其製藥組成物給藥至一個體。

【0112】 本文中說明之化合物亦可用來製備用於治療一種或多種如上指明之疾病的醫藥品。

【0113】 “處理”之詞意在包括預防性以及治療性處理。

【0114】 本案之化合物亦可以含一種或多種其他活性組成份，如適用於治療上述狀況之活性組成份的組合來給藥。例如治療呼吸道障礙之可能組合包括含有皮質類固醇(如布地奈德，二丙酸倍氯

米松，丙酸氟替卡松，糠酸莫米松，糠酸氟替卡松)， β 激動劑(如特布他林，沙丁胺醇，沙美特羅，福莫特羅，茚達特羅)，黃嘌呤(如茶鹼)，毒蕈鹼拮抗劑，(如異丙托溴銨)及/或 p38 MAP 激酶抑制劑之組合。適當皮質類固醇之其他實例為環索奈德或氟尼縮松。適當的，該 β 激動劑為 β 2 激動劑。 β 2 激動劑之其他實例為瑞普特羅，維拉特羅，歐塔特羅，瑞普特羅及非諾特羅。毒蕈鹼拮抗劑之其他實例包括噻托溴銨，米克丁尼，格隆，阿地尼亞及達拉托平，任意的這些可例如呈溴鹽。治療呼吸道障礙之其他可能的組合為本案之化合物及磷酸二酯酶抑制劑。

【0115】 於一個具體例中，本案化合物可以含有抗病毒劑，例如阿昔洛韋，奧司他韋，扎那米韋(瑞樂沙[®])或干擾素之組合給藥。

【0116】 於一個具體例中，該活性組成份組合為共同配製。

【0117】 於一個具體例中，本案揭示之化合物係與作為吸入性製劑之皮質類固醇共同配製，例如用來維持 COPD 或肺癌之治療，包括預防後者。

【0118】 於一個具體例中，活性組成份之組合係簡單的共同配製。

【0119】 於一個具體例中，其係提供一包括下列之組合產物：

(A) 一本案揭示之化合物；及

(B) 其他活性組成份，如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑，磷酸二酯酶抑制劑及 p38 MAP 激酶抑制劑(如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑及 p38 MAP 激酶抑制劑)。

【0120】 其中，各組成份(A)及(B)係與製藥上可接受的稀釋劑或

載體配製成摻合物。該組合可任意包括其他相關之賦形劑。適當的 β 激動劑為 β_2 激動劑。

【0121】 於一個具體例中，其係提供根據申請專利範圍第 1 項之作為醫藥品之式(I)化合物以含有一種或多種其他活性組成份之組合一起給藥，如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑及 p38 MAP 激酶抑制劑。適當的 β 激動劑為 β_2 激動劑。

【0122】 於一個具體例中，本案化合物係藉由吸入給藥且皮質類固醇係口服給藥或藉由吸入給藥，以組合或分開。

【0123】 於一個具體例中，本案化合物係藉由吸入給藥且 β_2 激動劑係口服給藥或藉由吸入給藥，以組合或分開。

【圖式簡單說明】

圖式 1a: 為一直方圖，其係代表用化合物(I)或化合物 A 於小鼠呼吸道對於聚-I: C-引起之中性粒細胞累積之治療功效。

圖式 1b: 顯示化合物(I)對於化合物 A 於小鼠呼吸道對於聚-I: C-引起之中性粒細胞累積之抑制效價的比較。

圖式 2a: 為一直方圖，其係代表用化合物(I)或化合物 A 於小鼠 BALF 對於香煙煙霧引起之巨噬細胞累積的功效。

圖式 2b: 為一直方圖，其係代表用化合物(I)或化合物 A 於小鼠 BALF 對於香煙煙霧引起之中性粒細胞累積的功效。

圖式 3: 為一 X-射線粉末繞射(XRPD)圖，其得自型式 1 多晶型結晶樣品 (參見實例 2)。

圖式 4: 顯示一熱重分析(TGA) (上方圖)及差示掃描量熱分析(DSC) (下方圖)型式 1 多晶型結晶之樣品分析(參見實例

2)。

圖式 5: 為一 XRPD 圖示，其得自型式 2 多晶型結晶樣品(參見實例 4)。

圖式 6: 顯示一型式 2 多晶型結晶樣品之 TGA 分析(參見實例 4)。

圖式 7 顯示一型式 2 多晶型結晶樣品之 DSC 分析(參見實例 4)。

圖式 8: 為型式 2 多晶型結晶樣品之 DVS 等溫線(參見實例 4)。

圖式 9: 為型式 2 多晶型結晶樣品於質量繪圖之 DVS 改變(參見實例 4)。

圖式 10: 顯示型式 2 多晶型結晶樣品 DVS 分析之前(下方圖)及之後(上方圖)所得到之 XRPD 圖示(參見實例 4)。

圖式 11: 顯示於之前(下方圖)及於 25°C/96% RH (中間圖)及 40°C/75% RH (上方圖)儲存 1 週後 (參見實例 4)得到之型式 2 多晶型結晶樣品之 XRPD 圖示。

圖式 12: 為 XRPD 圖示，其得自型式 3 多晶型結晶樣品 (參見實例 8)。

圖式 13: 顯示一型式 3 多晶型結晶樣品之 TGA (上方圖)及 DSC (下方圖)分析(參見實例 8)。

圖式 14: 為對於型式 3 多晶型結晶樣品之 GVS 分析(參見實例 8)。

圖式 15: 顯示 XRPD 圖示，其係得自對於型式 3 多晶型結晶樣品之 GVS 分析之前(下方圖)及之後(上方圖) (參見實例 8)。

圖式 16: 顯示型式 3 多晶型結晶樣品之 XRPD 圖示，其得自於儲存之前(下方圖)及儲存於 25°C/96% RH 及 40°C/75% RH (上方圖)一週之後(參見實例 8)。

圖式 17: 顯示一 XRPD 圖示之重疊，其得自型式 7 (上方圖)，型式 6，型式 5，型式 4，型式 3，型式 2 及型式 1 (下方圖)之樣品(參見實例 9 至 12)。

【實施方式】

實驗章節

【0124】 本文中所使用之縮寫係定義如下(表 1)。任何未定義之縮寫意在傳達其等普遍接受之含義。

表 1: 縮寫

Aq	水性
Ac	乙醯
ACD	葡萄糖枸橼酸溶液
ATP	腺苷-5'-三磷酸鹽
BALF	支氣管肺泡灌洗液
br	廣域
BSA	牛血清白蛋白
COPD	慢性阻塞性肺部疾病
CXCL1	CXC 區趨化因子配體 1
CXCL8	CXC 區趨化因子配體 8
d	雙峰
DCM	二氯甲烷
DMA	二甲基乙醯胺
DMAP	4-二甲基胺基吡啶
DMSO	二甲亞砜
EDC.HCl	1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺氫氯化物
ELISA	酶聯免疫吸附試驗
(ES ⁺)	電噴霧電離，正向模式

Et	乙基
EtOAc	醋酸乙酯
EtOH	乙醇
FACS	螢光激活細胞分類
FCS	胎牛血清
FITC	異硫氰酸螢光素
FP	丙酸氟替卡松
HPLC-MS	高效液體色層分離法-質譜法
hr	小時
HRP	辣根過氧化物酶
IFN γ	干擾素 γ
i-n	鼻內
i-t	氣管內
IL-4	白介素 4
IL-5	白介素 5
IL-13	白介素 13
IL-17	白介素 17
LPS	脂多醣
IPA	異丙醇[丙-2-醇]
M	莫耳
(M+H) ⁺	質子化的分子離子
MCP-1	單核細胞趨化蛋白
MDA	丙二醛
Me	甲基
MeOH	甲醇
MHz	兆赫
min	分鐘
MIBK	甲基異丁基酮
MOMA-2	抗-單核細胞及巨噬細胞抗體
MTT	3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物
m/z	質荷比
NH ₄ OAc	醋酸銨
nm	奈米
NMP	N-甲基吡咯烷酮
NMR	核磁共振(光譜)
OVA	卵清蛋白

PBMC	末梢血單核細胞
PBS	磷酸鹽緩衝食鹽水
Pd ₂ (dba) ₃	三(二苯亞甲基丙酮)二鈀(0)
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	聯(三苯基膦)鈀(II)二氯化物
Ph	苯基
PIP ₂	磷脂酰肌醇 4,5-雙磷酸鹽
PIP ₃	磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸鹽
PMA	佛波酯
po	藉由口服給藥
PPh ₃	三苯基膦
q	四峰
quin	五峰
R ^t	維持時間
RH	相對濕度
RT	室溫
RP HPLC	逆相高效液相色層分離法
s	單峰
SDS	十二烷基硫酸鈉
SEM	平均值的標準誤差
t	三峰
TBME	甲基第三丁基醚
THF	四氫呋喃
TMB	3,3',5,5'-四甲基聯苯胺
TNF α	腫瘤壞死因子 α
TR-FRET	時間分辨螢光共振能量轉移

一般程序

【0125】 所有起始物質及溶劑係得自市售來源或根據文獻引證來製備。除非另有說明所有反應係經攪拌。有機溶液係例行的於無水硫酸鎂上乾燥。

【0126】 管柱色層分離法係於預填充矽膠 (230-400 篩孔, 40-63 μm) 匣中使用指定量來進行。

分析方法

分析性 LCMS

【0127】 分析性 LCMS 係用 Waters Xselect CSH C₁₈ 3.5 μm 管柱 (4.6 x 50 mm)，流速 2.5-4.5 毫升/分鐘，用含有 0.1% v/v 甲酸之 H₂O-MeCN 梯度於 4 分鐘期間洗提而進行。梯度資料：0-3.00 分鐘，斜度為由 95% H₂O-5% MeCN 至 5% H₂O-95% MeCN；3.00-3.01 分鐘，維持於 5% H₂O-95% MeCN，流速提昇至 4.5 毫升/分鐘；3.01-3.50 分鐘，維持於 5% H₂O-95% MeCN；3.50-3.60 分鐘，回到 95% H₂O-5% MeCN，流速降低至 3.50 毫升/分鐘；3.60-3.90 分鐘，維持於 95% H₂O-5% MeCN；3.90-4.00 分鐘，維持於 95% H₂O-5% MeCN，流速降低至 2.5 毫升/分鐘。含有銜份之樣品係藉由其等之 UV 吸光度於 254 nm 檢測。洗提峰的質譜係使用 Agilent 6120 四極質譜儀，於混合的正離子和負離子電噴霧模式下操作。

¹H NMR 光譜

【0128】 ¹H NMR 光譜係於 Bruker Avance III 光譜儀上以 400 MHz 使用殘留之未氘化的溶劑作為參考而得到，且除非特別說明，係以 DMSO-d₆ 運行。

X-射線粉末繞射-方法 1 (使用 Brucker AXS C2 GADDS 繞射儀)

【0129】 繞射圖之收集係使用：Cu Kα 輻射 (40 kV, 40 mA)，自動化 XYZ 階段，自動-樣品定位之雷射視頻顯微鏡及 HiStar 2-維面積檢測器。X-射線光學器件係含有一單一 Göbel 多層鏡配上 0.3 mm 之針孔準直器。光束發散度，亦即於樣品上之 X-射線束的有

效大小為約 4 mm。使用 θ - θ 連續掃描模式，樣品-檢測器距離為 20 cm，其有效 2θ 範圍為 3.2° - 29.7° 。典型的，該樣品係暴露至 X-射線束達 120 秒。該所使用來收集數據之軟體為 GADDS 供 XP/2004 4.1.43 且該數據係使用 Diffrac Plus EVA v13.0.0.2 或 v15.0.0.0 來分析及呈現。於周遭環境下運行的樣品係使用如收到時未經研磨之粉末製備成平板標本。將約 1-2 毫克樣品輕壓至一載玻片上而得到一個平坦的表面。將於非周遭環境下運行的樣品安裝在含有熱傳導化合物之矽膜片上。然後將樣品以 $20^\circ\text{C}/\text{分鐘}$ 加熱至適當溫度且隨即維持恆溫達 1 分鐘，之後開始收集數據。

X-射線粉末繞射-方法 2 (使用 Brucker AXS D8 advance 繞射儀)

收集繞射圖示，使用 $\text{Cu K}\alpha$ 輻射 (40 kV, 40 mA)， θ - 2θ 測角儀，及發散 V4 及接收縫隙，Ge 單色儀及 Lynxeye 檢測器。用來收集數據之軟體為 Diffrac Plus XRD Commander v2.6.1 且該數據係用 Diffrac Plus EVA v13.0.0.2 或 v15.0.0.0 來分析及呈現。樣品係於周遭環境下以平板標本使用粉末作為接收物來運行。將該樣品輕輕地裝入一切割成拋光，零-背景(510)矽膜片之室腔。於分析期間將該樣品旋轉至其自身平面。收集數據之細節為：角度範圍：2 至 $42^\circ 2\theta$ ；步長： $0.05^\circ 2\theta$ ；收集時間：0.5 秒/步。

X-射線粉末繞射-方法 3 (使用 PANalytical (Philips) X'PertPRO MPD 繞射儀)

該儀器裝設有 Cu LFF X-射線管。將化合物散佈在零背景樣品座上。所使用之儀器參數如下：發電機電壓：45 kV；發電機安培數：40

mA；幾何學：Bragg-Brentano；階段：微調階段。測量條件如下：
掃描模式：連續；掃描範圍：3 至 50° 2 θ ；步長：0.02°/步；計數
時間：30 秒/步；微調器旋轉時間：1 秒；輻射類型：CuK α 。入
射光束路徑參數如下：方案。發散縫隙：15 mm；Soller 縫隙：0.04
rad；光束罩：15 mm；抗散射屏蔽：1°；光束刀：+。繞射光束路
徑參數如下：長抗散射屏蔽：+；Soller 縫隙：0.04 rad；Ni 過濾
器：+；檢測器：X'Celerator。

差示掃描量熱分析 – 方法 1 (使用 Mettler DSC 823e 儀器)

Mettler DSC 823E 係配備有 34 個位置之自動採樣器。該儀器係用
認證之鋼校正能量及溫度。典型的，將各樣品 0.5-3 毫克，於一針
-孔鋁鍋，以 10 °C/分鐘由 25 °C 加熱至 300 °C。於樣品上維持 50
毫升/分鐘之氮氣吹掃。該儀器控制及數據分析軟體為 STARe
v9.20。

差示掃描量熱分析-方法 2 (使用 TA-Instruments Q1000 MTDSC， 裝備有 RCS 冷卻部件)

將 TA-Instrument 樣品鍋用適當的蓋子蓋住並於裝備有 RCS 冷卻部
件之 TA-Instruments Q1000 MTDSC 記錄 DSC 曲線。使用下列參
數：初始溫度：25°C；加熱速率：10°C/分鐘；最終溫度：250°C。

熱重分析-方法 1 (使用 Mettler TGA/SDTA 851e 儀器)

於裝備有 34 個位置之自動採樣器之 Mettler TGA/SDTA 851e 上收
集 TGA 數據。將該儀器用認證之鋼校正溫度。典型的，將各樣品

5 – 30 毫克負載至預秤重之鋁坩堝且以 10 °C/分鐘由週遭溫度加熱至 350 °C。在樣品上維持 50 毫升/分鐘之氮氣吹掃。儀器控制及數據分析軟體為 STARe v9.20。

熱重分析(TGA) –方法 2 (使用 TA-Instruments Q500 TGA 熱天平)

於 TA-Instruments Q500 TGA 熱天平上收集 TGA 數據。於用下列參數分析之前，將該化合物轉移至鋁樣品鍋：起始溫度：室溫；加熱速率：20°C/分鐘；解析因子：4；最終狀況：350°C 或 <80[(w/w)%]。

重量水分吸附(GVS)

吸附等溫線係使用 SMS DVS Intrinsic 水分吸附分析儀而獲得，藉由 DVS Intrinsic Control 軟體 v1.0.1.2 (或 v 1.0.1.3)來控制。將樣品溫度藉由儀器控制而維持於 25 °C。藉由摻合乾及濕氮氣而控制濕度，總流速為 200 毫升/分鐘。相對濕度係藉由經校正之 Rotronic 探針(動態範圍為 1.0 – 100 %RH)來測量，位於靠近樣品。作為%RH 之函數的樣品之重量改變，(大規模放鬆)係由微量天平持續監控(準確度±0.005 毫克)。典型的，將 5 – 20 毫克樣品於週遭狀況下置於一已秤空重有孔不銹鋼籃子中。將樣品於 40 %RH 及 25 °C (典型的於房間狀況)負載及未負載。吸濕等溫線係如下所述而進行(4 個掃描給予 2 個完整的循環)。該標準等溫線係於 25 °C 在 10 %RH 區間於 0 – 90 %RH 範圍時進行。數據分析係於 Microsoft Excel 使用 DVS Analysis Suite v6.2 (或 6.1 或 6.0)來進行。

表 2: SMS DVS Intrinsic Experiments 之方法參數

參數	值
吸附 -掃描 1 及 3	40 - 90
解析/吸附 -掃描 2 及 4	90 - 0, 0 - 40
間隔(%RH)	10
掃描數	4
流速 (毫升/分鐘)	200
溫度(°C)	25
穩定度(°C/分鐘)	0.2
吸附時間(小時)	逾時 6 小時

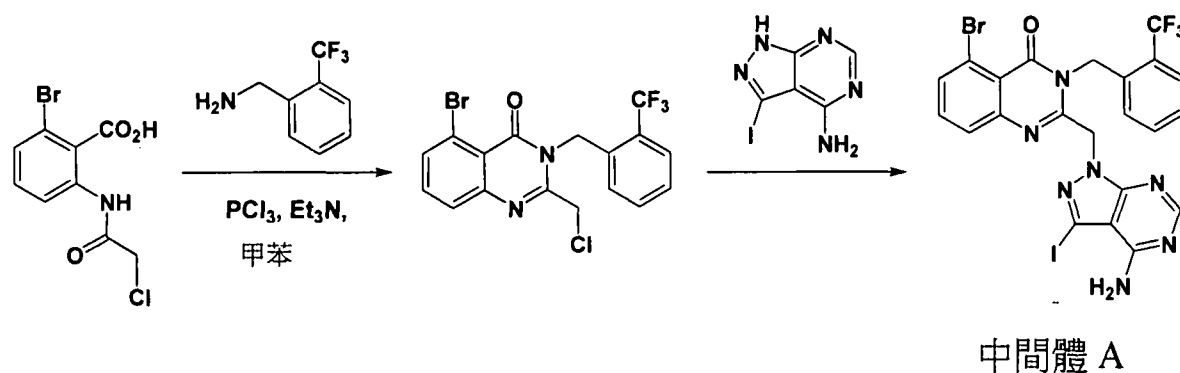
該樣品係於完成等溫線後回收並藉由 XRPD 再分析。

動態蒸氣吸附(DVS)

【0130】 將約 20 毫克化合物轉移至 SMS 動態蒸氣吸附並使用下列參數紀錄於 25°C 之大氣濕度重量改變：乾燥：60 分鐘於乾氮氣；平衡：60 分鐘；RH (%) 測量點：循環 1：5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5；循環 2：10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0。

實例 1 - 化合物(I)及化合物 (Ia)之製備

中間體 A：2-((4-胺基-3-碘-1H-吡唑並[3,4-d]嘓啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹唑啉-4(3H)-酮。



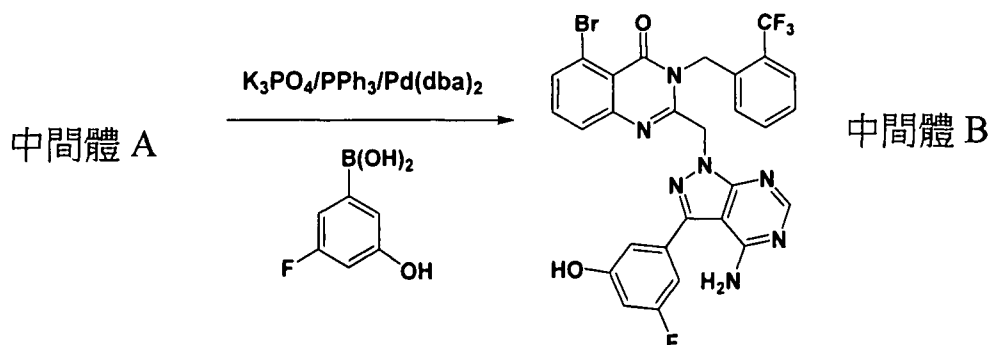
【0131】 於 -1°C 時，於一含有 2-溴-6-(2-氯乙醯胺)苯甲酸 [King-Underwood 等，WO2011/048111]，(50.0 克，171 毫莫耳)，(2-(三氟甲基)苄基)甲胺(29.4 毫升，205 毫莫耳)及三乙胺(34 毫升，430 毫莫耳)於甲苯 (1.2 升)之經攪拌混合物中，將含有三氯化磷(37 毫升，430 毫莫耳)於甲苯(100 毫升)之溶液於 1 小時期間逐滴加入，於此期間，溫度維持在低於 5°C 。將反應混合物加熱至回流達 2.5 小時且然後趁熱將產生的懸浮液過濾。保留濾液並將收集之固體懸浮於新鮮甲苯 (100 毫升)中，並於劇烈攪拌時加熱至 90°C 。將固體藉由過濾法移除並將該含有粗產物之有機萃出物合併。

【0132】 第二批此物質係藉由在相同條件相同規模下重複該反應而製備。將來自該兩個反應之合併濾液於真空中蒸發並將殘質用 IPA (2 x 400 毫升)碾製。將如此得到之粗物質於真空中乾燥而得到呈灰白色固體之 5-溴-2-(氯甲基)-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮(100 克，90%純度藉由 HPLC，61%)； R^t 2.70 分鐘； m/z 431/433 ($M+H$)⁺ (ES)⁺。

【0133】 於室溫時，於一含有喹啉酮，得自如上，(100 克，90%純度，210 毫莫耳)及 3-碘-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-4-胺(50.4 克，193 毫莫耳)於 DMF (600 毫升)之溶液中添加碳酸鉀 (80.0 克，580 毫莫耳)且於 18 小時後，將反應混合物倒至水中(1.2 升)。藉由過濾法收集所產生的沉澱物，且隨即用水(500 毫升)，用 EtOAc (600 毫升)且最後用 Et_2O (400 毫升)清洗。將產生的餅於真空中乾燥而得到呈灰白色固體之標的化合物，中間體 A，(115 克，89%)； R^t 2.28 分鐘， m/z 656/658 ($M+H$)⁺ (ES)⁺。

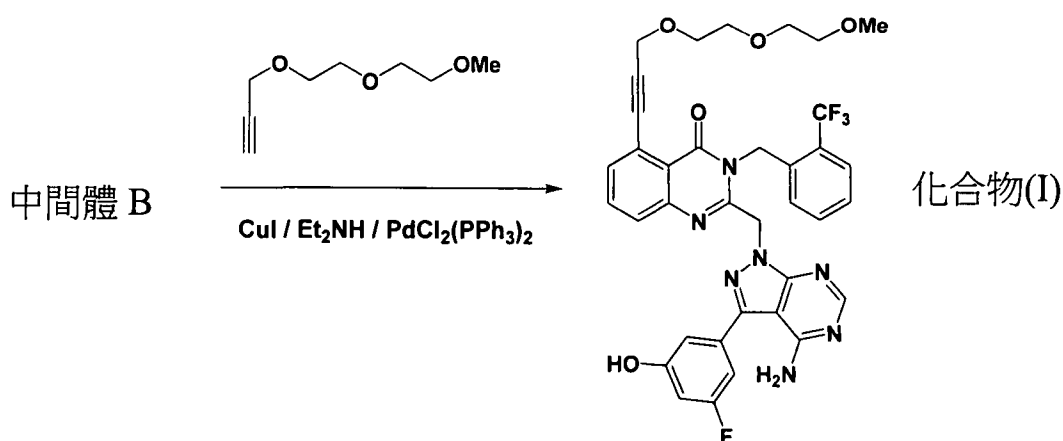
【0134】 中間體 B：2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苄基)-1H-吡啶並

[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-
 酮。



【0135】 於室溫時，將一含有中間體 A (54.4 克，83.0 毫莫耳)，(3-氟-5-羥基苯基)硼酸(15.5 克，99.0 毫莫耳)及 K_3PO_4 (19.1 克，83.0 毫莫耳)於 1-丁醇(900 毫升)之溶液用氮氣吹掃 20 分鐘。將混合物用 PPh_3 (3.26 克，12.4 毫莫耳)及用 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.90 克，2.07 毫莫耳)處理且用氮氣再吹掃 10 分鐘且於氮氣流中加熱至 90°C 。40 小時後，將混合物冷卻至 70°C 並將水(250 毫升)逐滴加入。將混合物冷卻至 50°C 達 3 小時且然後至室溫達 3 天，於此期間，形成灰棕色沉澱。藉由過濾法收集該固體，用 1-丁醇 (2 x 100 毫升)及水 (2 x 100 毫升)清洗且然後於 40°C 真空中乾燥而得到呈灰白色固體之標的化合物，中間體 B(35.2 克，65%)； R^t 2.25 分鐘， m/z 640/642 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (ES^+)。

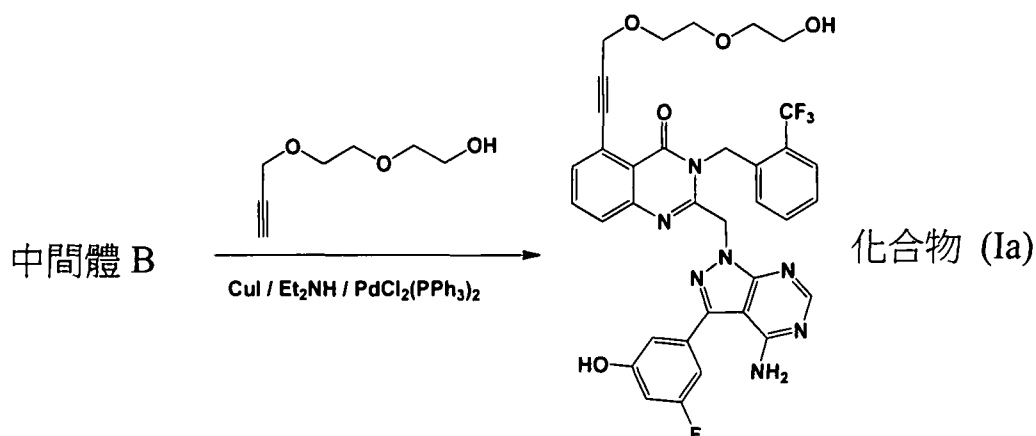
【0136】 化合物(I)：2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苯基)-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-(3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔-1-基)-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮。



【0137】 將一含有中間體 B (35.2 克, 55.0 毫莫耳), 3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔[King-Underwood 等, WO2011/048111], (17.4 克, 110 毫莫耳), PdCl₂(PPh₃)₂(3.86 克, 5.50 毫莫耳)及碘化銅(I) (1.05 克, 5.50 毫莫耳)於含有 Et₂NH 及 DMF (4: 1 v/v, 820 毫升)之混合物的懸浮液於室溫用氮氣吹泡 10 分鐘。將混合物加熱至 65°C 達 1.5 小時且然後冷卻至 RT。將蒸發物於真空中蒸發並將殘質於 EtOAc (600 毫升)及飽和水性 NH₄OAc (650 毫升)中分佈。將含水層分離並用 EtOAc (300 毫升)萃取且將合併之有機層於真空中蒸發而得到暗褐色黏稠油。將甲醇(200 毫升)加入並將該混合物於室溫攪拌 16 小時。形成黃色沉澱, 將其藉由過濾法收集並用 MeOH (100 毫升)清洗。將於兩個分離批次中所產生的固體藉由閃蒸管柱色層分離法予以純化(SiO₂, 330 克, MeOH 於 DCM, 0-6%, 梯度洗提)。將經純化之物質一起於混合物 DCM/MeOH (10: 1 v/v) 中提取而得到一均相溶液, 然後將其蒸發並於真空中乾燥而得到呈灰白色固體之標的化合物, 化合物(I), (20.1 克, 51%); R^t 2.15 分鐘, m/z 718 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ: 3.19 (3H, s), 3.35-3.38 (2H, 重疊 m), 3.44-3.49 (4H, 重疊 m), 3.60-3.63 (2H, 重疊 m), 4.37 (2H, s), 5.49 (2H, s), 5.76 (2H, s), 6.42 (1H, d), 6.65 (1H,

m), 6.73 (1H, m), 6.79 (1H, m), 7.15 (1H, t), 7.28 (1H, t), 7.52 (1H, d), 7.65-7.69 (2H, 重疊 m), 7.82 (1H, m), 8.12 (1H, s), 10.15 (1H, s)。

【0138】 化合物(Ia): 2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苯基)-1H-吡唑並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-(3-(2-(2-羥基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔-1-基)-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮。



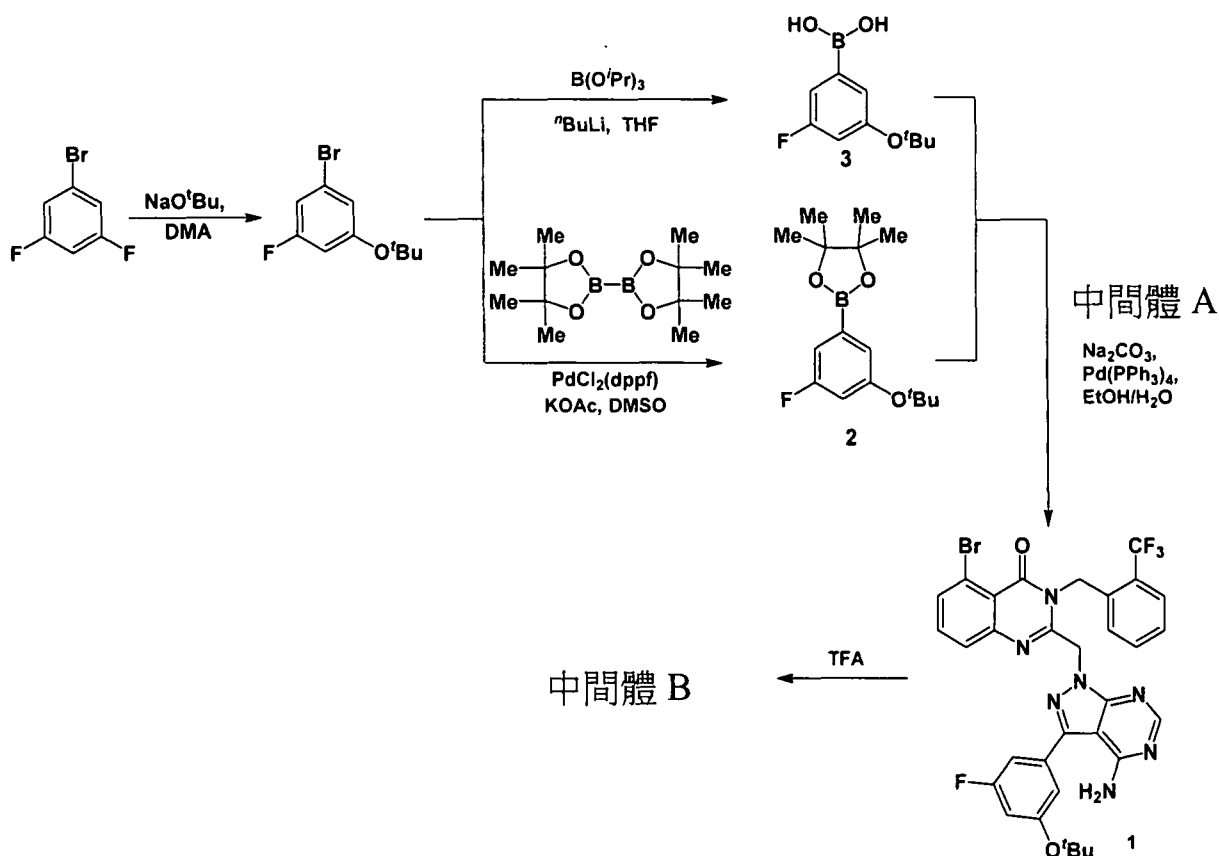
【0139】 將一含有中間體 B (190 毫克, 0.297 毫莫耳), 2-(2-(丙-2-炔-1-基氧基)乙氧基)乙醇[King-Underwood 等, WO2011/048111] (257 毫克, 0.890 毫莫耳), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (208 毫克, 0.297 毫莫耳) 及碘化銅 (57 毫克, 0.30 毫莫耳) 於混合物 Et_2NH 及 DMF (4: 1 v/v, 7.5 毫升) 之懸浮液用 N_2 脫氣且然後加熱至 60°C 達 16 小時。將反應混合物冷卻至室溫並於真空中蒸發至矽膠上並藉由閃蒸管柱色層分離法(SiO_2 , 12 克, MeOH 於 DCM, 0-5%, 梯度洗提) 予以純化而得到呈淡褐色固體之標的化合物, 化合物 (Ia), (30 毫克, 14%); R^t 1.88 分鐘, m/z 704 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ (ES^+); $^1\text{H NMR}$ δ : 3.36-3.50 (6H, 重疊 m), 3.61-3.63 (2H, 重疊 m), 4.37 (2H, s), 4.58 (1H, m), 5.48 (2H, s), 5.76 (2H, s), 6.41 (1H, d), 6.64 (1H, m), 6.72 (1H, d), 6.78 (1H, s), 7.14 (1H, t), 7.27 (1H, t), 7.52 (1H, d), 7.65-7.71

(2H, 重疊 m), 7.82 (1H, t), 8.13 (1H, s), 10.19 (1H, br s)。

【0140】 根據結構上類似化合物之分析(參見 WO2011/048111), 化合物(I)被認為不太可能會具有阻轉異構型。由阻轉異構型造成之藥物研發的額外複雜性及結果類似於那些由分子異構現象之其他來源所產生者, 如立體中心的存在。此特性使得此等分子均為對掌性, 且除非解析, 消旋混合物; 其中之組成份可具有不同的藥理和毒理表現。此特性可能會顯著的提高此等分子之下游開發成本, 且因此沒有化合物(I)之阻轉異構型是非常期望且為有利的特性。

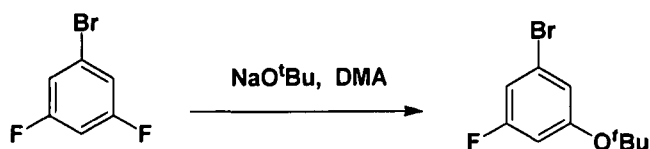
實例 2 – 呈型式 1 多晶型結晶之化合物(I)的製備

呈型式 1 多晶型結晶之化合物(I)係由中間體 B 開始製備, 其可依照下列程式所概述而製備:



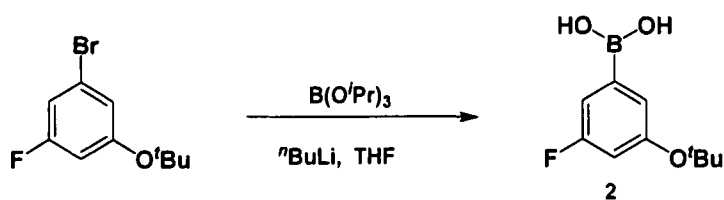
【0141】 該中間體的製備方法載列如下。

1-溴-3-(第三丁氧基)-5-氟苯



【0142】 將第三醇鈉(284 克, 3.89 莫耳)逐份加至一冰冷之 DMA (2.0 升)中, 接著逐滴加入 1-溴-3,5-二氟苯(298 毫升, 2.59 莫耳)。於添加完成時, 將混合物回暖至室溫並攪拌 72 小時。將水(200 毫升)加入並將產生的膠狀沉澱物過濾出來。將上層清液於真空中濃縮並將殘質藉由真空蒸餾法予以純化。將產生的油溶解於二乙醚(1.0 升), 用水(6 x 250 毫升)清洗, 乾燥(MgSO₄)並於真空中濃縮而得到呈無色油之標的化合物(220 克, 881 毫莫耳, 34.0%): b.p. 84-86 °C (8 毫巴); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.35 (9H, s), 6.64 (1H, dt), 6.92-6.96 (2H, 重疊 m)。

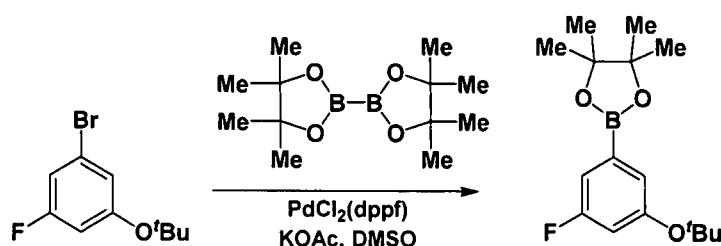
【0143】 (3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)硼酸; 2



於 -78 °C, 於一含有 1-溴-3-(第三丁氧基)-5-氟苯(75.0 克, 304 毫莫耳)於 THF (1.0 升)之溶液中逐滴加入正丁基鋰(2.5 M 於己烷, 150 毫升, 337 毫莫耳)。將產生的混合物於此溫度攪拌 45 分鐘且

將三異丙基硼酸酯(105 毫升, 455 毫莫耳)逐滴加入。將混合物於該溫度攪拌 1.5 小時, 且然後於 1.5 小時期間回暖至 -5°C 。將混合物用二乙醚(1.0 L)及 1M HCl 水溶液(450 毫升)稀釋並將各層分離。將含水層用更多二乙醚(2 x 250 毫升)來萃取。將合併之有機萃出物乾燥(MgSO_4), 過濾且然後於真空中蒸發得到淡黃色油。將固體再次溶解於異己烷(300 毫升)並再次濃縮而得到灰白色黏稠固體。將固體用異己烷(150 毫升)碾製並過濾而得到白色粉末。將物質於 2M NaOH (600 毫升)及二乙醚(600 毫升)中分佈。收集含水層並將有機物用更多 NaOH (2 x 200 毫升)萃取。有顯著數量之物質不溶並將其過濾, 用二乙醚清洗(藉由 LCMS 確認為乾淨產品)。將鹼性含水層於冰浴中冷卻並用濃 HCl (~ 130 毫升)酸化至 pH 1。將含水層用 DCM (3 x 300 毫升)萃取並將合併之有機物乾燥(Na_2SO_4), 過濾並於真空中濃縮而得到一灰棕色粉末。將其用異己烷(100 毫升)碾製而再次得到乾淨產品。合併兩批次而得到呈灰白色粉末之標的化合物 2 (17.2 克, 73.0 毫莫耳, 24.1 %): R^t : 1.87 分鐘。

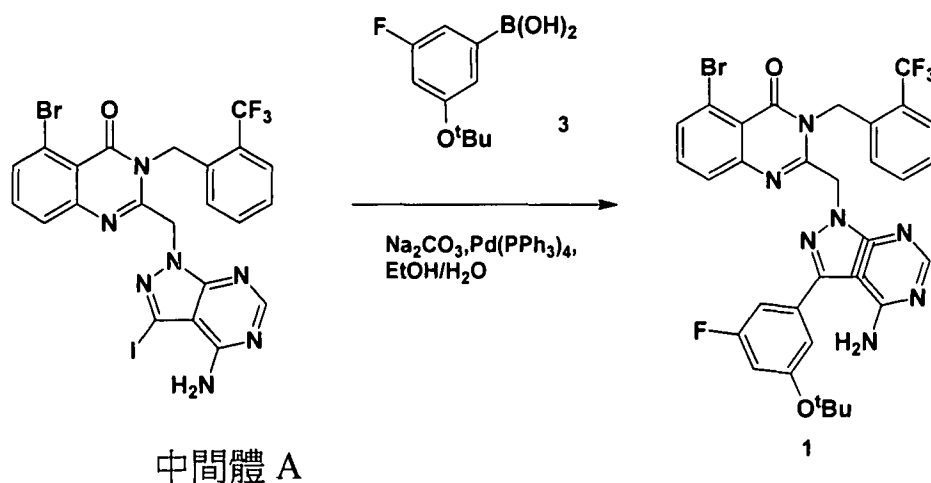
【0144】 2-(3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二噁硼烷 ; 3



將一含有鈹(II)二氯化物-1,1'-聯(二苯基膦)二茂鐵(6.81 克, 9.31 毫莫耳), 醋酸鉀(54.8 克, 558 毫莫耳)及 4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-

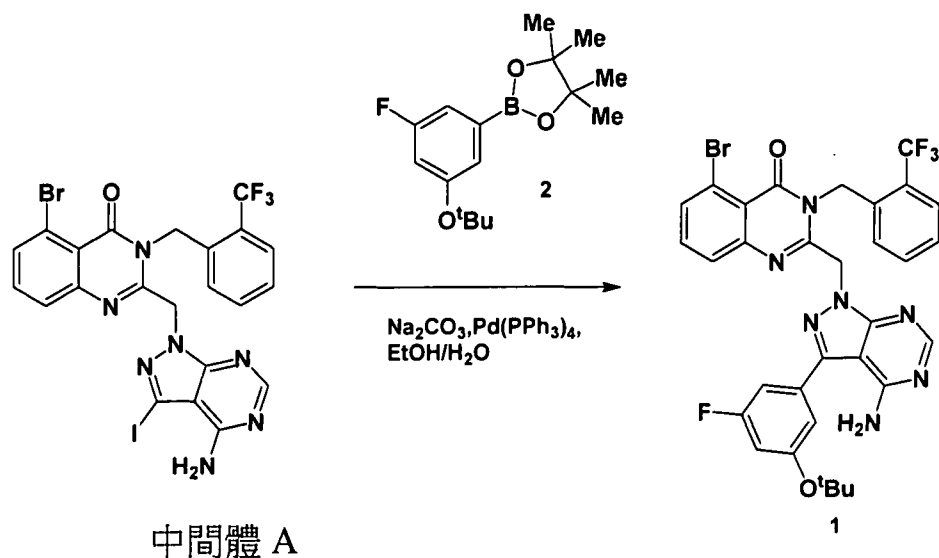
雙(1,3,2-二噁硼烷) (52.0 克, 205 毫莫耳)之混合物用氮氣沖洗並於其中加入含有 1-溴-3-(第三丁氧基)-5-氟苯(46.0 克, 186 毫莫耳)於 DMSO (528 毫升)之溶液。將產生的混合物以超音波處理 3 分鐘, 脫氣 5 分鐘並於 80°C 加熱 23 小時。將反應混合物於二乙醚(500 毫升)及水(500 毫升)中分佈。將含水層再用二乙醚 (3 x 400 毫升)萃取。將合併之有機萃出物用鹽水(300 毫升)清洗, 乾燥(MgSO₄), 過濾並於真空中蒸發而得到一暗褐色殘質。將此殘質溶解於異己烷/EtOAc 之混合物中, 經由矽膠短塞過濾並於真空中蒸發而得到淡褐色固體。將固體殘質再吸收至矽膠並藉由管柱色層分離法予以純化(SiO₂, 用 0-4% EtOAc 於異己烷洗提, 梯度洗提)而得到呈白色固體之標的化合物 3。(27.0 克, 87.0 毫莫耳, 46.8%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.31 (12H, s), 1.34 (9H, s), 6.78 (1H, m), 7.17-7.20 (2H, 重疊 m)。

【0145】 2-((4-胺基-3-(3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)-1H-吡唑並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮; 1 (由硼酸, 3)



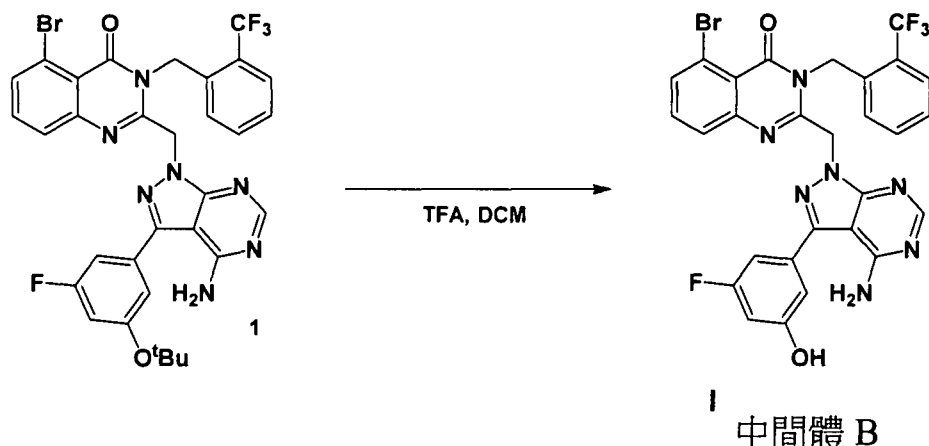
【0146】 將含有中間體 A (2 x 10.0 克, 14.9 毫莫耳), (3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)硼酸 3 (2 x 3.17 克, 14.9 毫莫耳), 十水碳酸鈉(2 x 6.75 克, 23.6 毫莫耳)及鈹四三苯基磷(2 x 0.52 克, 0.45 毫莫耳)於 EtOH/水 (9: 1, 2 x 500 毫升) 混合物之混合物用氮氣脫氣, 超音波處理達 10 分鐘且然後於 65 °C 氮氣中攪拌 18 小時。將反應混合物合併並將溶劑於真空中移除, 將殘質溶解於 10% MeOH 之 DCM 溶液(500 毫升)中並用飽和醋酸銨溶液(400 毫升)清洗。將含水層再次用 10% MeOH 之 DCM 溶液(2 x 400 毫升)萃取。將合併之有機萃出物於真空中蒸發並將殘質再吸收至矽膠並藉由閃蒸管柱色層分離法予以純化(用 0-40% EtOAc 於 DCM 洗提, 梯度洗提)而得到呈灰黃色固體之標的化合物 1 (8.4 克, 9.89 毫莫耳, 32.4%): R^t 2.70 分鐘, 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.37 (9H, s), 5.50 (2H, s), 5.78 (2H, s), 6.49 (1H, d), 6.91 (1H, t), 6.95 (1H, dt), 7.04 (1H, m), 7.15 (1H, t), 7.28 (1H, t), 7.54 (1H, d), 7.68-7.72 (2H, 重覆 m), 7.83 (1H, dd), 8.15 (1H, s)。該物質約為 80%純度。

【0147】 2-((4-胺基-3-(3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)酮;
1 (由硼酸酯, 2)



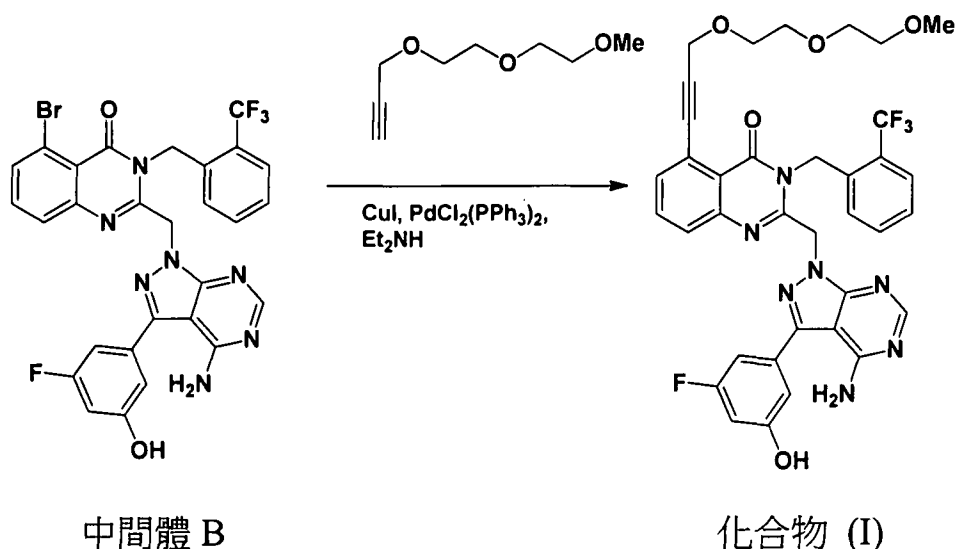
【0148】 將一含有中間體 A (10.0 克，14.9 毫莫耳；製備如說明於實例 1)，2-(3-(第三丁氧基)-5-氟苯基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二噁硼烷 2 (6.59 克，22.40 毫莫耳) (3.17 克，14.9 毫莫耳)，十水碳酸鈉 (26.75 克，23.6 毫莫耳)及鈀四三苯基膦 (0.52 克，0.45 毫莫耳)於 EtOH/水 (9: 1, 500 毫升)混合物之混合物用氮氣脫氣，超音波處理 10 分鐘且然後於 65 °C 氮氣中攪拌 40 小時。於真空中移除溶劑，將殘質溶解於 10% MeOH 之 DCM 溶液 (250 毫升)中且用飽和醋酸銨溶液(200 毫升)清洗。將含水層再次用 10% MeOH 之 DCM 溶液 (2 x 200 毫升)萃取。將合併之有機萃出物於真空中蒸發並將殘質再吸收至矽膠並藉由閃蒸管柱色層分離法予以純化(用 0-40% EtOAc 之 DCM 洗提，梯度洗提)而得到呈灰黃色固體之標的化合物(4.5 克，6.14 毫莫耳，41.1%)：R^t 2.70 分鐘。

【0149】 2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苯基)-1H-吡啶並[3,4-d]嘧啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮



【0150】 於一含有 2-((4-胺基-3-(3-(第三丁氧基)-5-)-1H-吡唑並 [3,4-d]嘓啶-1-基)甲基)-5-溴-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮 1 (13.0 克, 18.6 毫莫耳)於 DCM (150 毫升)之溶液中加入三氟醋酸(21.6 毫升, 280 毫莫耳)並將產生的溶液攪拌 2 小時。將溶劑於真空中移除。將殘質於 DCM (200 毫升)及 NaHCO₃ 飽和溶液(200 毫升)中提取。將含水層再次用 10% MeOH 之 DCM (2 x 100 毫升)萃取並將合併之有機萃出物於真空中蒸發。將殘質再吸收至矽膠上並藉由閃蒸色層分離法用 0-3% MeOH 之 DCM 予以洗提而純化得到呈白色固體之標的化合物 1b (7.60 克, 11.8 毫莫耳, 63.0%): m/z 640 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.47 (2H, s), 5.78 (2H, s), 6.43 (1H, d), 6.65 (1H, dt), 6.75 (1H, m), 6.79 (1H, t), 7.14 (1H, t), 7.28 (1H, t), 7.53 (1H, d), 7.69-7.73 (2H, 重疊 m), 7.85 (1H, m), 8.13 (1H, s), 10.18 (1H, d)。

【0151】 化合物(I): 2-((4-胺基-3-(3-氟-5-羥基苯基)-1H-吡唑並 [3,4-d]嘓啶-1-基)甲基)-5-(3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔-1-基)-3-(2-(三氟甲基)苄基)喹啉-4(3H)-酮, 呈型式 1 多晶型結晶



【0152】 將一含有 3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔(4.69 克，29.7 毫莫耳)，碘化銅(226 毫克，1.19 毫莫耳)，中間體 B(7.6 克，11.9 毫莫耳)及聯(三苯基膦)鈀(II)二氯化物(833 毫克，1.19 毫莫耳)於二乙胺(330 毫升)之混合物徹底的用氮脫氣並於 60 °C 攪拌 3 小時。將更多 3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔(400 毫克)，聯(三苯基膦)鈀(II)二氯化物(167 毫克，0.24 毫莫耳)及碘化銅 (0.45 克，0.24 毫莫耳)添加至二乙胺(30.0 毫升)並於 60 °C 攪拌 3 小時。將另一份 3-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙氧基)丙-1-炔 7 (400 毫克)，聯(三苯基膦)鈀(II)二氯化物(167 毫克，0.24 毫莫耳)及碘化銅 (0.45 克，0.24 毫莫耳)加入並將反應混合物於 60 °C 再攪拌 7 小時。將溶劑於真空中移除，將殘質溶解於 10% MeOH 之 DCM 溶液 (200 毫升)中並用醋酸銨水溶液(10wt%，300 毫升)清洗。將含水層再次用 10% MeOH 之 DCM 溶液(2 x 200 毫升)萃取。將合併之有機層於真空中蒸發。將殘質於 MeOH (30.0 毫升)中漿化過夜並過濾。將固體殘質吸收至矽膠並藉由管柱色層分離法(SiO₂，用 0-5% MeOH 之 DCM

洗提，梯度洗提)予以純化而得到呈黃褐色固體之型式 1 多晶型結晶型式之化合物(I) (4.73 克, 6.52 毫莫耳, 55.0%): m/z 718 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.20 (3H, s), 3.35-3.39 (2H, 重疊 m), 3.43-3.50 (4H, 重疊 m), 3.60-3.64 (2H, 重疊 m), 4.38 (2H, s), 5.49 (2H, s), 5.77 (2H, s), 6.42 (1H, d), 6.65 (1H, dt), 6.74 (1H, dq), 6.79 (1H, t), 7.15 (1H, t), 7.28 (1H, t), 7.52 (1H, d), 7.65-7.72 (2H, 重疊 m), 7.83 (1H, m), 8.13 (1H, s), 10.19 (1H, s)。

【0153】 此物質樣品之 XRPD 分析係使用一般過程之 XRPD 方法 2 來進行。該物質為結晶如顯示於所得到之 XRPD 圖示(圖式 3)，但亦含有一些無定形物質。

【0154】 對於型式 1 多晶型結晶樣品之 DSC 分析(使用一般過程之 DSC 方法 1)係顯示於圖式 4 (下方圖)，在那裡可以看出樣品經過多次加熱事件。於 102 °C 之一個廣泛的吸熱峰後接著為於 141 °C 之放熱峰，接著為於 174 °C 更清晰的吸熱峰。於加熱期間觀察到形成新穎多晶型結晶-之後發現為型式 2 多晶型結晶。對於型式 1 多晶型結晶樣品之 TGA 分析 (使用一般過程之 TGA 方法 1) (圖式 4; 上方圖)顯示由周遭至 75 °C 時重量損失 0.34%，可能是因為游離溶劑及/或吸濕性水之蒸發。

實例 3 - 呈型式 2 多晶型結晶之化合物(I)的製備

方法 1

型式 2 多晶型結晶可如下藉著由 1-丙醇溶液中結晶出來而製備。於 100 毫升反應器中加入 1.98 克化合物(I)及 49.5 毫升 1-丙醇(25

升/公斤)。將混合物攪拌並回暖至 95 °C (於 92 °C 見到溶液)。將溶液維持於 95 °C 達 30 分鐘後冷卻至 23 °C 達 10 小時，於 72 °C 自發性的結晶。將該非均相混合物攪拌 4 小時，然後將沉澱過濾出來並用 1-丙醇 (2 毫升)清洗。將產物於 45 °C 真空中乾燥 18 小時而得到 1.71 克型式 2 多晶型結晶，產率為 86.4%。

方法 2

該型式 2 多晶型結晶由 1-丙醇溶液中結晶出來亦可如下藉由植晶以型式 2 多晶型結晶之結晶而促進。將 1-丙醇(25.00 升/公斤, 275.0 毫升)添加至化合物(I) (11.00 克)中。將混合物以 350 rpm 於 25 °C 攪拌。然後將非均相混合物於 40 分鐘期間回暖至 97 °C (回流溫度)，維持於 97 °C 達 5 分鐘，然後於 5 分鐘期間冷卻至 96 °C，然後維持於 96 °C 達 1 小時。將該均相微橘色溶液於 15 分鐘期間冷卻至 5 °C。然後將攪拌速度降至 250 rpm 並將溶液種晶以型式 2 多晶型結晶 (0.01 公斤種晶/公斤化合物(I)啟始物質，0.11 克)。將混合物於 85 °C 攪拌 10 分鐘，然後於 8 小時期間冷卻至 22 °C，採用非線形參數為 2.3 之立體冷卻。將該非均相混合物於 22 °C 攪拌 10 小時之後將沉澱物過濾。將產物用 1-丙醇(1.00 升/公斤，8.84 克，11.00 毫升)清洗然後於 45 °C (週末;72 小時)乾燥而得到型式 2 多晶型結晶 (9.5 克，86.4 %)。

方法 3

型式 2 多晶型結晶可藉由將型式 1 多晶型結晶於甲醇，乙醇，2-丙醇，1-丙醇，丙酮，醋酸乙酯，乙腈，甲苯，醋酸異丙酯，TBME，

2-丁酮，DMSO，二乙醚，MIBK，庚烷，硝基甲烷，10%水/乙醇，10%水/乙腈或 10%水/2-丙醇中漿化而製備。

方法 4

型式 2 多晶型結晶可藉由將非晶型式之化合物(I)於甲醇，乙醇，2-丙醇，1-丙醇，丙酮，醋酸乙酯，乙腈，甲苯，醋酸異丙酯，TBME，2-丁酮，DMSO，二乙醚，MIBK，硝基甲烷，10%水/乙醇或 10% 水/2-丙醇中漿化而製備。

方法 5

型式 2 多晶型結晶之大規模準備法如下：將 200 毫克型式 1 多晶型結晶秤重添加至 20 毫升閃爍瓶中。將 50 體積之甲醇加入並將樣品於 20 °C 及 50 °C 之間漿化 24 小時（每個溫度各 4 小時）其間持續以 500 rpm 攪拌。將產生的物質於真空中過濾並於 40 °C 真空中乾燥過夜。

實例 4 -呈型式 2 多晶型結晶之化合物(I)的特性化

型式 2 多晶型結晶之樣品的 XRPD 分析係使用一般過程之 XRPD 方法 3 來進行。所得到之 XRPD 圖示係顯示於圖式 5。

【0155】 型式 2 多晶型結晶之樣品的 TGA 分析係使用一般過程之 TGA 方法 2 來進行。所得到之數據係顯示於圖式 6，由此，顯而易見該型式 2 多晶型結晶顯示由 155 °C 上升至 200 °C 時重量損失 $\pm 0.5\%$ 。

【0156】 型式 2 多晶型結晶之樣品的 DSC 分析係使用一般過程

之 DSC 方法 2 來進行。所得到之數據係顯示於圖式 7，由此，顯而易見型式 2 多晶型結晶顯示於 190.1°C 融溶分解(最大峰)。

【0157】 型式 2 多晶型結晶樣品之 DVS 等溫線係顯示於圖式 8 且於質量圖之 DVS 變化係顯示於圖式 9。該型式 2 多晶型結晶係被觀察到由 0% RH 上升至 95% RH 逐步吸收水 $\pm 0.4\%$ 且水之攝入是可逆的，說明了型式 2 不吸濕。

【0158】 型式 2 多晶型結晶樣品之靜態穩定性研究證明該樣品於固體型式係對濕氣穩定的，因為於 DVS 分析 (參見圖式 10)及 1 週之儲存於 25°C/96% RH 及 40°C/75% RH (參見圖式 11，使用 XRPD 方法 1 之一般過程)之後，藉由 XRPD (使用一般過程之 XRPD 方法 3)未注意到有改變。

實例 5 - 呈型式 2 多晶型結晶之微粒化化合物(I)的穩定性

微粒化型式 2 多晶型結晶係使用 5 公分 Jetmill 微粒化裝置來製備以生產下列之粒子大小分佈： $D_{10} = 1.14 \mu\text{m}$ ； $D_{50} = 1.94 \mu\text{m}$ 且 $D_{90} = 3.39 \mu\text{m}$ (粒子大小分佈係使用激光繞射法來確定(Malvern Mastersizer 儀器)。

【0159】 該微粒化物質係藉由 TGA，XRPD，及 DSC 於時間零及於不同儲存條件後進行分析。將樣品儲存於下列條件：(i) 7 週於 RT/<5% RH；(ii) 7 週於 RT/56% RH；(iii) 7 週於 RT/75% RH；(iv) 7 週於 50 °C；及(v) 7 週於 40 °C/75% RH。

【0160】 該顯示於表 3 之數據指出該樣品於晶體學上及熱力學上係穩定的，因為於不同狀況下，未觀察到顯著的變化。

表 3: 型式 2 多晶型結晶之穩定性數據(微粒化)

狀態	TGA		XR D	IR	DSC		外觀
	<100	<185°C			最大 (°C)	額外(°C)	
0 天	0.1	0.3	REF	REF	188.4	113.3(17 J/g)	白
RT/<5 % RH*	0.1	0.3	~Ref	~Ref	188.6	113.8(11 J/g)	白
RT/56%RH*	0.1	0.4	~Ref	~Ref	188.5	113.7(8 J/g)	白
RT/75 % RH*	0.2	0.4	~Ref	~Ref	188.7	113.7(10 J/g)	白
50°C*	0.0	0.3	~Ref	~Ref	187.8	119.8 (3 J/g)	白
40°C/75%RH*	0.1	0.2	~Ref	~Ref	188.5	117.4 (1 J/g)	白

* 達 7 週；REF = 結晶參考組；~Ref = 與參考組一致

實例 6 –呈無定形型式之化合物(I)的製備

無定形型式之化合物(I)係藉由將該型式 1 多晶型結晶 (使用實例 2 之過程而得到)加熱至 120 °C 而製備。

實例 7 –呈型式 3 多晶型結晶之化合物(I)的製備

方法 1

該型式 3 多晶型結晶可藉由於二氯甲烷中漿化呈無定形型式之化合物(I)而製備。

方法 2

型式 3 多晶型結晶之大規模製備法如下：將 200 毫克型式 1 多晶型結晶添加至 4 毫升含有 5 體積二氯甲烷之瓶中。將樣品渦旋 30 秒。然後再添加 5 體積 DCM 並將樣品再渦旋 30 秒。將樣品過濾並於 25°C 真空乾燥箱中經過一週末。

實例 8 – 呈型式 3 多晶型結晶之化合物(I)的特徵敘述

型式 3 多晶型結晶樣品之 XRPD 分析係使用一般過程之 XRPD 方法 2 來進行。該 XRPD 圖示係顯示於圖式 12。

【0161】 對於型式 3 多晶型結晶樣品所得到之 TGA 及 DSC 數據(使用一般過程之 TGA 方法 1 及 DSC 方法 1)係顯示於圖式 13。該型式 3 多晶型結晶於約 186 °C 熔融並分解(波峰；DSC -下方圖)。

【0162】 對於型式 3 多晶型結晶樣品所得到之 GVS 等溫線係顯示於圖式 14，其中，0-90% RH 觀察到 0.99%之質量改變。

【0163】 型式 3 多晶型結晶樣品之狀態穩定性研究證明該樣品於固體型式係對濕氣穩定的，因為於 GVS 分析 (參見圖式 15)及 1 週之儲存於 25°C/96% RH 及 40°C/75% RH (參見圖式 16；使用一般過程之 XRPD 方法 1)之後藉由 XRPD (使用一般過程之 XRPD 方法 2)未注意到有改變。

實例 9 – 呈型式 4 假多晶型之化合物(I)的製備

將呈型式 1 多晶型結晶之化合物(I) (20 毫克)或呈無定形式之化合物(I)(20 毫克)秤重至 HPLC 瓶中。然後於室溫將 THF 增量添加並振盪達 1 分鐘。然後將樣品於 50 °C 振盪(500 rpm)達 15 分鐘，之後再添加 THF。繼續此步驟直到添加了 80 體積之 THF 而得到一溶液。將溶液以 0.1 °C/分鐘由 50 °C 冷卻至 5 °C 並維持於 5 °C 過夜。然後將溶液任其蒸發以便得到一固體。將固體於真空中過濾，風乾(於真空中)達 2 小時，之後藉由 XRPD 使用一般過程之 XRPD

方法 1 予以分析。使用呈無定形型式之化合物(I)作為起始物質所得到之固體樣品的 XRPD 圖示係顯示於圖式 17 且相關於型式 4 假多晶型。

【0164】 將使用型式 1 多晶型結晶作為起始物質所得到之固體樣品於 25°C 真空乾燥箱中乾燥達 >48 小時，之後再次藉由 XRPD 予以分析。於此延長之乾燥期間後，觀察到該型式 4 多晶型結晶轉化為無定形型式之化合物(I)。因此，該型式 4 假多晶型為一亞穩定溶劑合物。

實例 10 – 呈型式 5 假多晶型之化合物(I)的製備

將呈型式 1 多晶型結晶 (20 毫克)之化合物(I)或呈無定形型式之化合物(I) (20 毫克)秤重至 HPLC 瓶中。然後於室溫將 1,4-二噁烷遞增振盪加入達 1 分鐘。然後於下次添加 1,4-二噁烷之前將樣品於 50 °C 振盪 (500 rpm)達 15 分鐘。繼續此步驟直到添加了 80 體積之 1,4-二噁烷而得到溶液。將該溶液以 0.1 °C/分鐘由 50 °C 冷卻至 5 °C 並維持於 5 °C 過夜。然後將溶液予以蒸發以便得到一固體。將該固體於真空中過濾，風乾(於真空中)2 小時，之後藉由 XRPD 用一般過程之 XRPD 方法 1 進行分析。該使用不定型型式之化合物(I)作為起始物質所得到之固體樣品之 XRPD 圖示係顯示於圖式 17 且相關於型式 5 假多晶型。將使用型式 1 多晶型結晶作為起始物質而得到之固體樣品於 25 °C 真空烘箱中乾燥 >48 小時，之後再次藉由 XRPD 進行分析。在延長乾燥時間之後，該型式 5 假多晶型並未改變型式。進行其他的特性鑑定而產生 ¹H NMR，TGA 及 DSC 數據(未顯示)，其等顯示該型式 5 假多晶型於溶劑耗損後還原

回無定形型式之化合物(I)。因此，該型式 5 假多晶型為亞穩定溶劑合物。

實例 11 –呈型式 6 假多晶型之化合物(I)的製備

將呈無定形型式之化合物(I) (20 毫克)稱重至 HPLC 瓶中。且然後於室溫將 10% 水/乙腈加量振盪加入達 1 分鐘。然後將樣品於 50 °C 振盪 (500 rpm)達 15 分鐘，之後添加 10%水/乙腈。繼續此步驟直到添加了 80 體積之 10% 水/乙腈。將產生的漿液於 25 °C 及 50 °C 之間留待熟成(於各溫度各為 4 小時)，於 500 rpm 振盪 2 天。然後將固體於真空中過濾，風乾達 2 小時且藉由 XRPD 用一般過程之 XRPD 方法 1 進行分析。此物質樣品之 XRPD 圖示係顯示於圖式 17 且相關於型式 6 假多晶型。於 XRPD 分析之後，將此物質於 40 °C 真空乾燥箱中乾燥過夜。在延長乾燥時間之後，觀察到該型式 6 假多晶型耗損溶劑並轉化為型式 2 多晶型結晶。因此，該型式 6 假多晶型為亞穩定溶劑合物。

實例 12 –呈型式 7 假多晶型之化合物(I)的製備

將呈無定形型式之化合物(I) (20 毫克)稱重至 HPLC 瓶中。然後將 10% 水/丙酮於室溫振盪增量加入達 1 分鐘。然後將樣品於 50 °C 振盪(500 rpm)達 15 分鐘，之後再添加 10% 水/丙酮。繼續此步驟直到添加了 80 體積 10%水/丙酮。將產生的漿液於 25 °C 及 50 °C 之間留待熟成(於各溫度各為 4 小時)，於 500 rpm 振盪 2 天。後將固體於真空中過濾，風乾達 2 小時且藉由 XRPD 使用一般過程之 XRPD 方法 1 予以分析。此物質樣品之 XRPD 圖示係顯示於圖式

17 且相關於型式 7 假多晶型。接著 XRPD 分析之後，將物質於 40°C 真空乾燥箱中乾燥過夜。於此延長之乾燥期間之後，觀察到該型式 7 假多晶型已喪失溶劑並轉化為型式 2 多晶型結晶。因此，型式 7 假多晶型為亞穩定溶劑合物。

實例 13 – 型式 2 及型式 3 多晶型結晶之熱力學穩定性及其等之相互轉化

競爭性漿化實驗係於型式 2 及型式 3 多晶型結晶之 50: 50 混合物中進行。將 50 體積之溶劑加入並將樣品於設定之溫度攪拌(300 rpm)3 天。然後於 XRPD 分析之前，將所有樣品於真空中過濾並風乾達 30 分鐘。

【0165】 漿化實驗之結果係概述於下表 4:

表 4: 競爭性漿化結果

溶劑	溫和	觀察	XRPD 結果
氯仿	50°C	澄清溶液及固體	型式 2
氯仿	25°C	漿液	型式 2
氯仿	5°C	漿液	型式 2
乙腈	50°C	澄清溶液及固體	型式 2
乙腈	25°C	漿液	型式 2
乙腈	5°C	漿液	型式 2
10% 水 /ACN	50°C	澄清溶液及固體	型式 2
10% 水 /ACN	25°C	漿液	型式 2
10% 水 /ACN	5°C	漿液	型式 2
乙醇	25°C	漿液	型式 2
乙醇	40°C	漿液	型式 2
乙醇	60°C	澄清溶液及固體	型式 2
丙酮	25°C	漿液	型式 2

丙酮	40°C	漿液	型式 2
丙酮	60°C	澄清溶液及固體	型式 2
醋酸乙酯	25°C	漿液	型式 2
醋酸乙酯	40°C	漿液	型式 2
醋酸乙酯	60°C	澄清溶液及固體	型式 2

所有於型式 2 中產生的競爭性漿化實驗說明了此為較穩定的熱力學型式。

實例 14 – 試管內及生體內篩選方法和結果

試管內篩選

生物測試：實驗方法

酶抑制分析

該 PI3K 酵素係在 ATP 及 Mg^{2+} 離子存在之下催化由磷脂醯肌醇 4,5-二磷酸鹽(PIP2)成為磷脂醯肌醇 3,4,5-三磷酸鹽(PIP3)之磷酸化反應。該 PIP3 產物可藉著將生物素-PIP3 由包含鎊標記之抗-GST 單株抗體，一 GST-標記 Pleckstrin 同源物(PH)結構區，生物素化 PIP3 及鏈親和素-別藻藍蛋白(APC)之能量轉移絡合物中藉由時間分辨螢光共振能量轉移(TR-FRET) (HTRF[®]PI3K 酶分析, Millipore) 被置換而檢測。絡合物中之鎊於 330 nm 之激發造成能量轉移至 APC 及於 665 nm 之螢光發射，即便鎊本身於其特徵波長 620 nm 發射。該由 PI3K 活性所生成之 PIP3 產物係由絡合物中置換生物素-PIP3 並造成能量轉移損失(降低訊號)。

【0166】 將欲測試之化合物，於想要的最終濃度，添加至含有 PIP2 物質及重組體 PI3K 酶 (抑或 α , β 或 δ 等形, ex Millipore, 或 γ 等形 [p110 γ + p101 構築], ex United States Biological, Swampscott, MA) 之混合物中並將該混合物於室溫培育 2 小時。於

此培育後，將 ATP (10 μ M) 添加至酶/化合物/PIP2 物質混合物中並將所產生的混合物於室溫再培育 30 分鐘。然後將一含有生物素化 PIP3 之終止溶液及含有 GST 標記 GRP1 普列克底物蛋白同源物(PH) 結構區之檢測混合物及螢光加入並將混合物於室溫培育達 15-18 小時，之後於螢光微板讀數器(Synergy 4, BioTek UK, Bedfordshire, UK)上檢測。

【0167】 結果係根據公式來計算：APC 訊號(於 665 nm 輻射)/鎔訊號(於 620 nm 輻射) $\times 10^4$ 。各反應之抑制百分比係相關於 DMSO 治療控制組來計算，且然後由濃度-回應曲線計算 50%抑制濃度 (IC₅₀ 值)。

PI3K δ 細胞基底之分析

測定蛋白質之磷酸化狀況，Akt，PI3K δ 下游產物，訊號，而作為評估 PI3K δ 活化以回應刺激之方法。

【0168】 U937 細胞，得自人類，白血病細胞，單核細胞淋巴瘤細胞系，係藉由用 PMA (100 ng/毫升) 培育達 48 至 72 小時而分化為巨噬細胞-型式細胞。然後將細胞用測試化合物或載體預培育達 2 小時且然後藉由暴露至 H₂O₂ (10 mM, 5-7 分鐘) 而短暫刺激並將反應藉由將介質用 4% 甲醛溶液代替而停止。內源性過氧化物活性及甲醛係藉由用驟冷緩衝液(0.1% 疊氮化鈉，1% H₂O₂ 於 PBS 含 0.1% Triton X-100) 培育 20 分鐘而失活。將細胞用緩衝液(PBS，含有 0.1% Triton X-100) 清洗並用阻斷溶液(1% BSA 於 PBS) 培育 1 小時且然後再用緩衝液清洗並用抗-pAkt 抗體或抗-pan-Akt 抗體(兩者來自 Cell Signaling Technology) 培育過夜。用緩衝液(PBS，含有

0.1% Triton X-100)清洗後，將細胞用 HRP-共軛之第二抗體(Dako) 培育並將所產生的信號進行比色測定(OD: 450 nm，參考波長為 655 nm)使用 TMB 基質(由 R&D Systems, Inc.提供之基質試劑包)。

【0169】 此反應係藉由添加 H₂SO₄ 溶液(100 μL)而停止。然後將細胞用緩衝液(PBS, 含有 0.1% Triton X-100)清洗並施用 5%結晶紫溶液(100 μL)達 30 分鐘。用緩衝液(PBS, 含有 0.1% Triton X-100)清洗後，將 1% SDS (100 μL)添加至各孔中並將盤輕輕的震盪 1 小時後於 595 nm 測量吸光度(Varioskan[®] Flash, Thermo-Fisher Scientific)。藉由將 OD₄₅₀₋₆₅₅ 除以 OD₅₉₅ 讀數而校正 OD₄₅₀₋₆₅₅ 讀數之細胞數目。pAkt 訊號對於總 Akt 訊號之比率係用來定量 PI3K δ 之活化程度。計算每一孔洞之抑制百分比，相對於設定為 100%抑制之 10 μg/毫升標準控制組(LY294002)相對於設定為 0%抑制之僅有 H₂O₂ 控制組。該 IC₅₀ 值係藉由測試化合物之系列稀釋而產生的濃度-回應曲線來計算。

PI3K γ 細胞基底之分析

作為評估 PI3K γ 於回應刺激之活性的方法，蛋白質之磷酸化狀態，Akt, PI3K γ 發信號之下游產物，係用接下來之 MCP-1 刺激來測定。

【0170】 U937 細胞係藉由用 PMA (100 ng/毫升)培育達 48 至 72 小時而分化為巨噬細胞-型式細胞。然後將細胞用測試化合物或載體預培育達 2 小時且然後用 MCP-1 短暫刺激(10 nM, 1 分鐘)並將反應藉由將介質用 4%甲醛溶液代替而終止。內源性過氧化物活性及甲醛係藉由用驟冷緩衝液(0.1%疊氮化鈉, 1% H₂O₂ 於 PBS 含

0.1% Triton X-100) 培育達 20 分鐘而滅活。將細胞用緩衝液(PBS 含有 0.1% Triton X-100) 清洗且用阻斷溶液(1% BSA 於 PBS) 培育 1 小時且然後用緩衝液再清洗並用抗-pAkt 抗體或抗-pan-Akt 抗體(兩者來自細胞 Signaling Technology) 培育過夜。用緩衝液清洗後(PBS 含有 0.1% Triton X-100), 將細胞用 HRP-共軛第二抗體(Dako) 培育並將產生的訊號進行比色測定(OD: 450 nm, 參考波長為 655 nm) 使用 TMB 基質(由 R&D Systems, Inc. 提供基質試劑包)。

【0171】 此反應係藉由添加 1N H₂SO₄ 溶液(100 μL) 而終止。然後將細胞用緩衝液(PBS 含有 0.1% Triton X-100) 清洗並施用 5% 結晶紫溶液(100 μL) 達 30 分鐘。用緩衝液(PBS 含有 0.1% Triton X-100) 清洗後, 將 1% SDS (100 μL) 添加至各孔洞中並將平盤微微振盪達 1 小時, 之後, 於 595 nm 測量吸光度(Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific)。藉由將 OD₄₅₀₋₆₅₅ 除以 OD₅₉₅ 讀數而校正 OD₄₅₀₋₆₅₅ 讀數之細胞數目。pAkt 訊號對於總 Akt 訊號之比率係用來定量 PI3K γ 之活化程度。計算每一孔洞之抑制百分比, 相對於設定為 100% 抑制之 10 μg/毫升標準控制組(LY294002) 相對於設定為 0% 抑制之僅有 MCP-1 控制組。該 IC₅₀ 值係藉由測試化合物之系列稀釋使用 XL-Fit (idbs, Guildford, UK) 而產生的濃度-回應曲線來計算。

【0172】 超氧化物陰離子生產分析

作為評估 PI3Kδ 依賴細胞功能之方法, 係藉由化學發光法評估於 IFN_γ-填充之 U937 細胞的超氧化物陰離子生產。該 U937 細胞(購自 ATCC, Manassas, VA) 係用 10% FCS 於 37°C 維持於 RPMI 1640 (Invitrogen Ltd., Paisley, UK)。將細胞以 10⁷ 細胞/毫升之密度懸

浮於 40 毫升 10% FCS RPMI 1640 中，並用 20 μL of 100 μg /毫升 IFN γ 溶液(最終濃度: 50 ng/毫升)處理，並於 37°C，5% CO $_2$ 中培育達 4 天。

【0173】 將 IFN γ -填充之 U937 細胞以 0.2×10^6 細胞/孔洞接種於 96-孔洞盤上，並用測試化合物於飢餓介質(0.5% FCS RPMI1640-不含酚紅)預培育 2 小時。將來自釀酒酵母之 Zymosan A (10 毫克)(ex Sigma-Aldrich)再懸浮於 1 毫升之 150 mM NaCl 中並於 100°C 沸騰達 15 分鐘。沸騰後，將 Zymosan 顆粒用 1 毫升 PBS 清洗兩次，並用 0.5 毫升 BioParticlesTM 調理試劑(Life technologies)於 37°C 培育達 60 分鐘。將細胞用含有 Zymosan 顆粒溶液(10 μL)，分析緩衝液(85 μL)，發光氨(2.5 μL)及強化劑溶液(2.5 μL)之混合物處理，其等均來自(除了 Zymosan) Superoxide Anion Assay Kit (# CS1000, Sigma-Aldrich Ltd, Poole, UK)。化學發光所指示之釋放的超氧陰離子係每 15 分鐘多至 60 分鐘藉由發光計量測量法(Varioskan[®] Flash, Thermo-Fisher Scientific)來測量。

【0174】 使用培育 60 分鐘後之數據進行分析。計算各個孔洞之抑制百分比相對於 10 μg /毫升 IC87114，標準 PI3K δ 抑制劑，設定為 100% 抑制對比於 0%抑制之控制組。相對之 IC $_{50}$ 值係藉由測試化合物之系列稀釋而產生的濃度-回應曲線使用 XL-Fit (idbs, Guildford, UK)來計算。

【0175】 於 PBMCs，Cytostim-引起之細胞因子生成作為評估 PI3K δ -依賴細胞功能之方法，cytostim-引起之於 PBMC 之生產的 IL-4，IL-5，IL-13 及 IFN γ 係藉由 Luminex 多路復用分析來評估。由 Quintiles Limited (London, UK)招募所有健康的志願

者，並將血液樣品送到 Respivert Ltd。此研究係經由國內 Ethics Committee 核准，且所有受試者簽署知情同意書。

【0176】 將 PBMC 懸浮液(200 μ L； 2×10^6 細胞/毫升)添加至 96-孔洞盤。將細胞用含於乾淨 DMSO 之測試化合物或以 DMSO 作為載體(2 μ L)處理並於 RT 培育 1 小時。將 Cytostim (Miltentyi Biotec，Surrey，UK)以 1：50 之比率加入並將細胞培育 20 小時(37°C；5% CO₂)。將盤於 500 x g 旋轉 5 分鐘並收集上層清液。藉由 Luminex 使用高靈敏度細胞因子磁珠套組(#HSCYTMAG-60SK，Millipore，Watford，UK)來測量四個分析物(IL-4，IL-5，IL-13 及 IFN γ)如下：該磁性抗體珠係多路復用，並於 96-孔洞盤用標準，僅有介質或樣品(50 μ L)培育過夜，於 4°C 振盪。以套組中提供之 Millipore 清洗緩衝液用磁性洗板清洗兩次後，將珠用檢測抗體(50 μ L)培育 1 小時，於 RT 振盪。將組具所提供之鏈親和素-藻紅蛋白溶液加入達 30 分鐘，於 RT 振盪。清洗後，將珠再懸浮於鞘液(150 μ L)中並立即分析。設定好 Luminex 系統以計算 50 個珠並計算上層清液中之各分析物的量以對照於標準曲線。由濃度-抑制曲線使用 XL-Fit (IDBS，Guildford，UK) 以測定 IC₅₀ 值。

趨化作用至 MCP1

作為評估 PI3K γ 依賴細胞功能之方法，THP1 細胞趨化至 MCP-1 係使用 48 孔洞-趨化作用室來評估。來自人類單核細胞白血病細胞淋巴瘤細胞系之 THP1 細胞，(購自 ATCC Manassas，VA)用 10% FCS 於 37°C 維持於 RPMI 1640 (Invitrogen Ltd.，Paisley，UK)。將細胞再懸浮於 0.5% BSA/RPMI1640 (2×10^6 細胞/毫升)並於 37°C，5%

CO₂ 培育 10 分鐘。然後將細胞懸浮液整份(500 μL)用於乾淨 DMSO 之化合物或用 DMSO 作為載體(2.5 μL)處理 1 小時(37°C, 5% CO₂)。

【0177】 MCP1 (50 nM)係於 0.5% BSA/RPMI1640 中製備。將 MCP1 溶液 (50 μL)添加至 48-孔洞趨化室(AP48, NeuroProbe Inc., Gaithersburg, MD)之底盤各孔洞中。將聚碳酸酯膜(8 μm)安裝在底室, 且然後將頂盤安裝在底室及過濾膜。將細胞懸浮液整份(50 μL)用化合物或載體於添加至頂室之前小心的處理, 並將 0.5% BSA RPMI1640 (50 μL)施用於上。然後將該室靜置 2 小時(37°C, 5% CO₂)。然後將該膜小心的移除並將來自底室之樣品(25 μL)轉移至新 96 孔洞盤。

【0178】 將含 MTT (50 μL)於 10% FCS 不含酚紅之 RPMI1640 之溶液添加至各孔洞中, 並將該平盤培育 2 小時(37°C, 5% CO₂)。將乾淨 DMSO (100 μL)添加至各孔洞中以提取由 MTT 形成之甲臆並將該盤微微振盪達 1 小時, 之後, 於 595 nm 測量吸光度 (Varioskan[®] Flash, Thermo-Fisher Scientific)。將值與藉由 AS604850 (10 μg/毫升)抑制者, 一選擇性 PI3Kγ 抑制劑, 相較以計算相對之抑制百分比。相對之 EC₅₀ 值係由濃度-抑制曲線使用 XL-Fit (idbs, Guildford, UK)來測定。

【0179】 由得自 COPD 病患之中性粒細胞釋放之 CXCL8 治療由得自 COPD 病患之中性粒細胞釋放的 CXCL8 的功效係藉由 ELISA 分析來評估。所有病患係由 Quintiles Limited (London, UK) 招募, 並將血液樣品送到 Respivert Ltd。此研究係經由國內 Ethics Committee 核准, 且所有受試者簽署知情同意書。將全血(30 毫升)

與 ACD (5 毫升；包括：7.36 克檸檬酸，14.71 克檸檬酸鈉，9.91 克右旋糖於 250 毫升無菌，雙蒸水)及 6% 葡聚醣(15 毫升；稀釋於 0.9% NaCl)溫和的混合以移除紅血球。將管子於室溫培育 45 分鐘，且然後收集上層清液(白細胞富集餾份)，留下紅血球細胞。

【0180】 將此餾份予以低制動離心(10 分鐘，於 1200 rpm，4°C)。將上層清液抽吸並將小顆粒再懸浮於冰冷，無菌雙蒸 H₂O (10 毫升)中，並將 0.6 M KCl (4 毫升)於 30 秒後加入。將細胞懸浮液用無菌 PBS (至 50 毫升之最終體積)稀釋且然後於 1500 rpm 離心達 5 分鐘。將上層清液抽吸並將小顆粒再懸浮於 PBS (2.5 毫升)，並將來自相同提供者之兩個管子倒在一起。

【0181】 小心的將此細胞懸浮液使用 Pasteur 移吸管而層疊在 5 毫升 Ficoll-paqueTM premium (GE Healthcare Bio Science AB, Uppsala, Sweden)上，且然後離心(30 分鐘於 1500 rpm，低制動)。將管子底部分離出來的中性粒細胞再懸浮於 RPMI-1640 介質中 (Gibco, Paisley, UK)，含有 5% FCS 並以 4×10^5 細胞/孔洞之密度植晶於 96 孔洞盤中。於開始處理之前，將細胞培育 30 分鐘(37°C；5% CO₂)。

【0182】 將嗜中性粒細胞用測試化合物或用 DMSO 載體預培育 1 小時且然後用 TNF α (10 ng/毫升)予以刺激。於 TNF α 刺激後 3 小時收集不含細胞之上層清液，且用 DuoSet ELISA development kit (R&D systems, Abingdon, UK)藉由 ELISA 來測量 CXCL8。該所呈報之 IC₅₀ 值係由濃度-抑制曲線，用 XL-Fit (IDBS, Guildford, UK)來測定。

MTT 分析

PMA-分化之 U937 細胞用測試化合物(10 $\mu\text{g}/\text{毫升}$)預培育 4 小時或於載體 5% FCS 或 10% FCS 預培育 24 小時。將上層清液用新介質 (200 μL)替代且將 MTT 儲備溶液(10 μL , 5 毫克/毫升)添加至各孔洞中。培育 1 小時後，將介質移除，將 200 μL 之 DMSO 添加至各孔洞並將盤微微振盪達 1 小時，之後於 550 nm 讀取吸光度。計算各孔洞中細胞存活率之損失百分比，相對於載體(0.5% DMSO)-處理組。

生體內篩選：藥效學及抗炎活性

於小鼠，LPS-引起之呼吸道中性粒細胞累積

將未禁食 BALB/c 小鼠(6-8 週大)藉由氣管內給藥 (給藥體積 20 μL) 給予載體或給予測試化合物，於相對於開始 LPS 處理之時間點 T = -2 小時，-8 小時，或-12 小時。該 LPS 係於 0.5 毫克/毫升溶液中製備且使用 De Vibliss 超音波霧化器 2000 (7 毫升，於 30 分鐘期間暴露)予以氣溶膠化。於 LPS 刺激後 8 小時，將氣管插管且支氣管肺泡灌洗液(BALF)藉由灌注提取且然後經由氣管導管收回 PBS (1 毫升)至肺部。重覆此過程而得到約 2 毫升肺泡灌洗液。於 BALF 樣品中之總細胞數係使用血細胞計數器來測量。BALF 樣品之細胞離心塗片之製備係藉由於室溫時於 1200 rpm 離心達 2 分鐘且使用 DiffQuik 染色系統(Dade Behring)染色以便細胞分類計數。細胞係使用油浸顯微鏡來計數。數據係以每毫升 BALF 中之中性粒細胞數目(平均 \pm S.E.M)來表示。

【0183】 於大鼠中，LPS-引起之呼吸道中性粒細胞累積

將未禁食大鼠給藥以載體或測試化合物藉由氣管內給藥 (給藥體積 100 μ L), 於相對於開始 LPS 處理之時間點 T = -2h, -8h, 或 -12h。該 LPS(0.3 毫克/毫升)係使用 De Vibliss 超音波霧化器 2000 (7 毫升, 於 30 分鐘期間)予以氣溶膠化。於 LPS 刺激後 8 小時, 將氣管插管且支氣管肺泡灌洗液(BALF)藉由灌注提取且然後經由氣管導管收回 PBS (1 毫升)至肺部。重覆此過程而得到約 2 毫升肺泡灌洗液。

【0184】 於 BALF 樣品中之總細胞數係使用 Countess 自動細胞計數器(Invitrogen)來測量。BALF 樣品之細胞離心塗片之製備係藉由於室溫時於 1200 rpm 離心達 2 分鐘且使用 DiffQuik 染色系統(Dade Behring)染色以便細胞分類計數。細胞係使用油浸顯微鏡來計數。數據係以每毫升 BALF 中之中性粒細胞數目(平均 \pm S.E.M)來表示。

【0185】 於小鼠中, 卵清蛋白-引起之呼吸道嗜酸性粒細胞及中性粒細胞累積
於第 0 天及第 7 天, 將 BALB/c 小鼠 (6-8 週大)用 OVA 進行免疫 (10 μ g/老鼠, i.p.)。為了在肺部引發局部炎症反應, 重複的將小鼠於第 13-15 天之間用卵清蛋白溶液刺激而予以霧化(10 毫克/毫升, 30 分鐘暴露, De Vilbiss Ultraneb 2000)。於第 17 天, 各隻動物經由氣管內給藥而於最終 OVA 刺激前 2 小時接受載體或測試化合物。將動物麻醉 8 小時之後進行氣管切開術。藉由灌輸 PBS (1 毫升)至肺部而得到 BAL, 然後將其撤回。重覆此過程以提供約 2 毫升之肺泡灌洗液。於 BALF 樣品之總細胞數係用血細胞計數器來測量。BALF 樣品之細胞離心塗片之製備係藉由於室溫時於 200 rpm

離心達 5 分鐘且使用 DiffQuik 染色系統(Dade Behring)染色以便細胞分類計數。細胞係使用油浸顯微鏡來計數。數據係以每毫升鼻肺泡灌洗液中之細胞數目差異(平均 \pm S.E.M)來表示。

於小鼠中，聚-I: C-引起之細胞累積

將特定之無病原體 A/J 小鼠 (雄性, 5 週大)經鼻內給藥以聚(I: C)-LMW (1 毫克/毫升, 40 μ L) (InvivoGen, San Diego, CA, USA), 在麻醉下(3% 異氟醚), 每天兩次達 3 天。於各聚-I: C 處理之前 2 小時, 將測試物質經鼻內給藥(50 μ L 於 10% DMSO/等滲食鹽水載體)。於最終聚-I: C 刺激之後 24 小時, 將動物麻醉, 氣管插管且藉由灌輸進入等滲食鹽水(100 毫升/公斤)且然後由肺部撤回而做到支氣管肺泡灌洗(BAL)。於 BALF 樣品中之總細胞數係使用血細胞計數器於相位差顯微鏡中來測量。

【0186】 肺泡巨噬細胞及中性粒細胞之比例係藉由 FACS 分析使用抗-老鼠 MOMA2-FITC (巨噬細胞)或抗-老鼠 7/4-FITC (中性粒細胞)來測定。將細胞懸浮於 PBS 並用抗-MOMA2-FITC (2 μ g/毫升, Catalogue no SM065F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) 或抗-7/4-FITC (2 μ g/毫升, Catalogue no CL050F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany)於 30°C 時培育達 30 分鐘, 且然後用碘化丙啶對比染色以排除壞死細胞。將細胞用 PBS 清洗, 並移轉至 FACS 管中。將樣品設置在一流式細胞儀中(ALTRA II; Beckman Coulter Japan, Tokyo, Japan), 且用單參數 FL2 [PMT2] (FITC)含 log x-軸之直方圖作圖說明相對之 FITC 強度。數據檔係儲存供隨即之分析, 使用 Kaluza 分析軟體(1.2 版)來計算各細胞型式之比

例。

香煙煙霧模式

將 A/J 小鼠 (雄性, 5 週大) 暴露於香煙煙霧 (4% 香煙煙霧, 用壓縮空氣稀釋) 達 30 分鐘/天達 11 天, 小動物使用 Tobacco Smoke Inhalation Experiment System (Model SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan)。於香煙煙霧最終之暴露後, 將測試物質每天給予一次達 3 天(鼻內劑量, 包括 35 μ L 溶液於 50% DMSO/等滲食鹽水)。

【0187】 最終劑量給藥之後 12 小時, 將動物麻醉, 氣管插管且支氣管肺泡灌洗(BAL)係藉由將 PBS (100 毫升/公斤)灌輸進入且然後由肺部撤回而進行。於 BALF 樣品中之總細胞數係用血細胞計數器於相位差顯微鏡下測量。肺泡中巨噬細胞及中性粒細胞之比例係藉由 FACS 分析使用抗老鼠 MOMA2-FITC (巨噬細胞)或抗老鼠 7/4 (中性粒細胞)來測定。

【0188】 將細胞懸浮於 PBS 並用抗-MOMA2-FITC (2 μ g/毫升, Catalogue no SM065F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) 或抗-7/4-FITC (2 μ g/毫升, Catalogue no CL050F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany)於 30°C 時培育達 30 分鐘, 且亦用碘化丙啶(2 μ g/毫升)來對比染色以允許排除壞死細胞。將細胞用 PBS 清洗, 並移轉至 FACS 管子中。將樣品設置在一流式細胞儀中 (ALTRA II; Beckman Coulter Japan, Tokyo, Japan), 及單參數 FL2 [PMT2] (FITC) 繪製含 log x-軸之直方圖以描述相對之 FITC 強度。

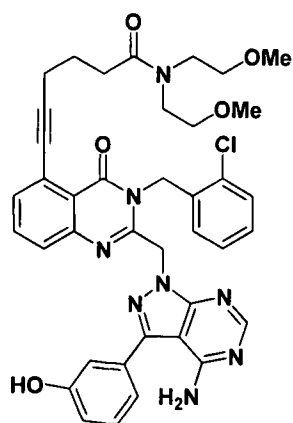
【0189】 數據檔係儲存以供隨即之分析，使用 Kaluza 分析軟體 (1.2 版)以計算各種細胞型式之比例。CXCL1(KC)，MCP1，TNF α ，IL-17 或骨橋蛋白於 BALF 之濃度係用 Quentikine[®]老鼠 KC，MCP1，TNF α ，IL-17 或骨橋蛋白 ELISA 套組(R&D systems，Inc.，Minneapolis，MN，USA)來測定。使用 OxiSelect[®] TBARS Assay Kit (MDA Quantitation；Cell Biolabs Inc，San Diego，CA，USA)來測量丙二醛之存在。

【0190】 試管內及生體內篩選結果之概述
式(I)化合物之試管內表現，如使用上述方法測定者，係呈現如下(表 5，6 及 7)。本發明化合物證明了 PI3K δ 及 γ 等形兩者之強大抑制性，且顯示對於 PI3K α 無抑制活性且於酶分析對於 PI3K β 僅有低抑制活性(表 5)。

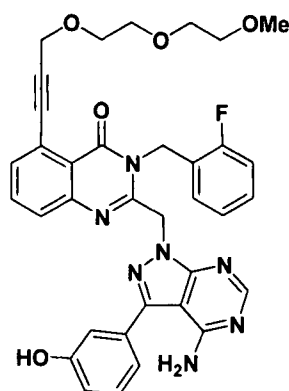
【0191】 這些功效轉化為用過氧化氫或 MCP-1 刺激細胞所引起之 Akt 磷酸化的強效抑制作用。未檢測到對細胞存活率，用式(I)化合物培育而產生，有影響(表 6)。再者，如本文所揭示，發現用式(I)化合物處理細胞可抑制由 U937 細胞生產 ROS 及由 cytoestim-刺激之 PBMC 生產細胞因子(表 7)。

【0192】 值得注意的是，式(I)化合物之可能的代謝產物，即相應的醇，化合物(Ia)，較式(I)化合物，為對於 PI3K δ 及 γ 等形兩者顯著較不活性之抑制劑(表 6)。因此，式(Ia)化合物，較式(I)化合物，為對於由 U937 細胞生產 ROS 及由 cytoestim-刺激之 PBMC 生產細胞因子顯著較不活性之抑制劑(表 7)。

表 5: 已知技藝化合物與化合物(I)之 PI3K 異型式抑制活性的比較。



化合物 A



實例 50

測試化合物	於所指出之同工酶對於 PI3K 抑制之 IC ₅₀ 值(nM)			
	PI3K α	PI3K β	PI3K δ	PI3K γ
化合物(I)	>13900	4890	2.5	28
化合物 A ¹	193	NT	12	25
實例 50 ²	653	NT	5.7	120

- 1) WO 2012/052753 中揭示之已知技藝化合物；
 2) WO 2011/048111 中揭示之已知技藝化合物；NT 未經測試；

表 6: 化合物(I)及(Ia)對於 PI3K 酶異型式之抑制活性；Akt 於細胞引起之磷酸化及對於細胞存活率之抑制。

測試 化合物	PI3 激酶抑制作用				細胞活性		細胞存活率	
	IC ₅₀ 值 於所指出之同工酶 (nM)				REC ₅₀ 值 ^a 於 d-U937 細胞(nM)		MTT Assay ^b 於 d-U937 細胞	
	δ	γ	α	β	H ₂ O ₂ 刺激	MCP-1 刺 激	於 4 小時	於 24 小時
(I)	2.5	28	>13900	4890	7.4	16.5	-ve	-ve
(Ia)	17	577	>14200	>14200	ND	ND	-ve	-ve

a) 引起之 Akt 磷酸化的抑制；b) -ve 係指一值<30% 抑制，於 10 μg/毫升；ND: 未處理

表 7: 式(I)化合物及(Ia)由 U937 細胞生產 ROS 及由 PBMC 釋放細胞因子之功效

細胞系	REC ₅₀ ¹ 或 IC ₅₀ ² 值(nM)	
	化合物(I)	化合物 (Ia)
Zymosan-引起之 ROS ^a 生產於 IFN _γ -填充之 U937 細胞 ¹	11.8	143
Cytostim-引起之 IL-4 於 PBMCs ²	<1.4	674
Cytostim-引起之 IL-5 於 PBMCs ²	<1.4	14.5
Cytostim-引起之 IL-13 於 PBMCs ²	<1.4	6.1
Cytostim-引起之 IFN _γ 於 PBMCs ²	13.8	60.8
THP1 細胞趨化作用至 MCP1 ¹	33.9	>14200

於中性粒細胞 TNF α -引起之 CXCL8，由 COPD 病患 1	2.2	ND
--	-----	----

a) ROS: 活性氧物種。

【0193】 用化合物(I)於小鼠及大鼠中，對於 LPS-引起之呼吸道中性粒細胞增多症的治療功效係分別報導於表 8 及 9。經發現治療可於兩品種對於 LPS-引起之中性粒細胞增多症產生劑量依賴抑制。再者，經發現該對於細胞累積之抑制功效可證明有長的作用期間。

表 8: 用化合物(I)對於大鼠之 LPS-引起之呼吸道中性粒細胞增多的治療功效。

化合物(I) (毫克/毫升)	於 BALF 之中性粒細胞數目 ($\times 10^5$ /毫升, 平均 \pm SEM)		
	於所指出之給藥前時間(%抑制性)		
	2 小時	8 小時	12 小時
載體	17.1 \pm 2.5	-	-
0.05	13.8 \pm 2.5 (19)	-	-
0.2	8.0 \pm 1.4 (53)	9.4 \pm 2.0 (45)	13.1 \pm 2.5 (23)
1.0	5.5 \pm 0.9 (68)	-	-

N = 8 隻動物(每組)

表 9：用化合物(I)對於大鼠於由 LPS-引起之呼吸道中性粒細胞增多症之治療功效。

化合物(I) (毫克/毫升)	於 BALF 之中性粒細胞數目 ($\times 10^5$ /毫升，平均 \pm SEM)		
	於所指出之給藥前時間(%抑制性)		
	2 小時	8 小時	12 小時
載體	15.1 \pm 2.6	-	-
0.05	13.2 \pm 2.3 (9)	-	-
0.2	6.3 \pm 1.6 (58)	10.1 \pm 1.8 (33)	13.6 \pm 2.7 (10)
1.0	4.1 \pm 0.7 (73)	-	-

N = 8 隻動物(每組)

【0194】 化合物(I)於小鼠對於過敏原刺激-引起之呼吸道嗜酸粒細胞增多及中性粒細胞增多症之治療功效係報導於表 10。經發現，於過敏原刺激之後，本文中所揭示用化合物治療小鼠，可對於嗜酸性粒細胞及中性粒細胞兩者累積於支氣管肺泡灌洗產生劑量依賴抑制。

表 10：於卵清蛋白致敏小鼠中，用化合物(I)對於卵清蛋白-引起之呼吸道嗜酸粒細胞增多及中性粒細胞增多之治療功效。

化合物(I) (毫克/毫升)	於 BALF 之細胞數目 ($\times 10^4$ /毫升，平均 \pm SEM)及(%抑制性)	
	嗜酸性粒細胞	中性粒細胞
	載體	24.7 \pm 3.1

0.05	19.7±3.2 (20)	8.0±0.4 (18)
0.2	3.8±0.9 (85)	2.9±0.5 (70)
1	2.1±0.4 (91)	2.0±0.3 (80)

N = 8 隻動物(每組)

【0195】 於將小鼠暴露至聚-I: C 之後，研究用化合物(I)及化合物 A 對於累積於 BALF 之巨噬細胞及中性粒細胞之治療功效。在這種直接比較中，發現用化合物(I)或化合物 A 治療產生對於聚-I: C-引起之累積至 BALF 之巨噬細胞及中性粒細胞之劑量依賴抑制性(表 11)。值得注意的是，化合物(I)顯示較化合物 A 具有顯著較大的效價且此數據用圖形來表示中性粒細胞 (圖式 1a)。

表 11: 用化合物(I)或化合物 A 於聚-I: C-引起之於小鼠呼吸道之細胞累積的治療功效。

化合物(I)或化合物 A (毫克/毫升)之處理及劑量	於 BALFa (x10 ⁴ /毫升)及(% 抑制性)之細胞數	
	巨噬細胞	中性粒細胞
載體	3.6±0.2	1.4±0.1
載體 + 聚 I: C	19.0±0.5	11.6±0.2
化合物(I) (0.002) + 聚 I: C	11.5±0.2 (49)	7.3±0.3 (43)
化合物(I) (0.02) + 聚 I: C	8.3±0.3 (69)	5.0±0.2 (65)
化合物(I) (0.2) + 聚 I: C	6.8±0.3 (79)	3.8±0.2 (77)
化合物 A (0.02) + 聚 I: C	14.3±0.3 (31)	8.9±0.2 (26)
化合物 A (0.2) + 聚 I: C	11.0±0.4 (52)	7.3±0.3 (42)
化合物 A (2) + 聚 I: C	7.8±0.2 (73)	4.8±0.2 (67)

a) 細胞數目之數據係以平均值 \pm SEM 來顯示；N = 5 隻動物/每組

表 12: 用化合物(I) \pm 丙酸氟替卡松對於香煙煙霧 (CS)-引起之細胞累積於小鼠 BALF 的治療功效。

化合物(I) (毫克/毫升)之處理 及劑量	於 BAL ^b (x10 ⁴ /毫升)及(% 抑制性)之細胞數	
	巨噬細胞	中性粒細胞
空氣 +載體	4.5 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2
CS + 載體	17.9 \pm 0.6	11.1 \pm 0.5
CS + 化合物(I) (0.02)	13.6 \pm 0.2 (32)	8.6 \pm 0.2 (26)
CS + 化合物(I) (0.2)	9.5 \pm 0.2 (63)	6.0 \pm 0.1 (54)
CS + 化合物(I) (2)	7.4 \pm 0.3 (79)	4.6 \pm 0.1 (68)
CS + 化合物(I) (0.02) + FP ^a	13.6 \pm 0.4 (32)	8.7 \pm 0.2 (26)
CS + 化合物(I) (0.2) + FP ^a	9.4 \pm 0.3 (63)	5.8 \pm 0.3 (55)
CS + 化合物(I) (2) + FP ^a	7.0 \pm 0.3 (81)	4.3 \pm 0.2 (71)

N = 5 隻動物(每組)；a) FP = 丙酸氟替卡松，劑量為 50 μ g/毫升；b) 細胞數目之數據係以平均值 \pm SEM 來顯示

【0196】 於暴露至香煙煙霧之後，測定以化合物(I)對於累積於 BALF 之巨噬細胞及中性粒細胞的治療功效(表 12)。於此研究中使用之香煙煙霧模式係報導為皮質類固醇難治系統[To, Y.等, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2010, 182: 897-904；Medicherla, S.等, J. Pharmacol. Exp. Ther.2008, 324: 921-9]且該數據顯示地塞米松(0.3-10 毫克/公斤, p.o.)，如預期，係無活性。用化合物(I)對於 BALF

中性粒細胞及對於活化之肺泡巨噬細胞數目之治療功效證明了其具有抗發炎活性，當作為單一治療給藥時。再者，當化合物(I)係與丙酸氟替卡松共同給藥，以於單一治療劑量缺乏顯著效果之劑量，檢測到顯著增強之抗發炎活性。在同時發生之中，評估用化合物 A 對於暴露至香煙煙霧之小鼠的治療功效。此等數據與呈現如上之化合物(I)者相較時，證明了化合物(I)較化合物 A 為對於香煙煙霧引起之於小鼠 BALF 之細胞累積更強大的抑制劑(圖式 2a 及 2b)。

【0197】 香煙煙霧之暴露亦提高發炎性生物標記物 CXCL1，MCP1，TNF α ，IL17，骨橋蛋白及丙二醛於支氣管肺泡灌洗液之濃度。用化合物(I)治療說明於劑量依賴方式中各生物標記物之濃度降低。再者，用化合物(I)及丙酸氟替卡松兩者以組合來治療時顯示生物標記物濃度降低量較單獨使用化合物(I)治療所達成者為大(表 13)。

表 13: 用化合物(I) ± 丙酸氟替卡松於小鼠 BALF 對於生物標記物之治療功效。

生物標記物	生物標記物濃度		抑制性 ¹ (%)					
	於 BALF 對照於治療組 (pg/毫升)		化合物(I)			化合物(I) (毫克/毫升) + FP2		
	空氣	香煙	0.02	0.2	2	0.002	0.02	0.2
CXCL1	8.4±0.1	18±0.3	32	52	71	32	58	77
MCP-1	2.3±0.2	7.2±0.1	28	45	78	29	53	73
TNF α	1.5±0.04	3.6±0.1	22	38	62	22	39	64
IL-17	1.2±0.1	2.7±0.1	27	41	60	26	51	67

骨橋蛋白	11±0.3	23±0.4	22	44	63	21	45	62
MDA	0.3±0.02 ₃	1.6±0.04 ₃	25	42	64	29	43	64

N = 每組 5 隻動物；1) 對於香煙之抑制百分比，2): 丙酸氟替卡松 (0.5 毫克/毫升)；3) 這些數據為 μM 值；係減去空氣控制值後之煙霧控制值

【0198】 綜上所述，本發明化合物對於 PI3K δ 及 γ 等形兩者為有效抑制劑。該試管內表現係於生體內轉換成一個廣泛的抗發炎表型。在此設定中，於呼吸道中，本文中揭示之化合物的抑制功效對於 Poly I: C-誘發之細胞累積是顯著的。亦特別引人注目的是，不同於 PI3K δ 選擇性抑制劑，單獨用本文中揭示之化合物(I)來治療對於香煙煙霧引起之呼吸道發炎造成顯著的抑制結果，且其等效果係於低劑量時發生，當其係與皮質類固醇，丙酸氟替卡松共同給藥，條件為單獨用皮質類固醇治療是無效的。

實例 15 – 包含化合物(I)之製藥製劑

化合物(I)之組成物可如下配製以使用於乾性粉末吸入器：

化合物(I)係藉由適當方法而微粒化，如空氣噴射研磨機而得到約 2 μm 之 D₅₀ 值且然後以含或不含硬脂酸鎂來配製於混合物中。將混合物填入單位劑量容器中(例如，膠囊，泡泡)以經由乾性粉末吸入器來吸用。所給製劑之實例中係含有 0 及 1%之間的硬脂酸鎂，舉個例子來說每劑量之填充重量為 25 毫克，且劑量強度範圍為由 1 至 1000 毫克(mcg)每劑量。亦可使用不同強度，不同含量之硬脂酸鎂及不同重量之每劑量。

表 14: 含有 0% 硬脂酸鎂之製劑

每劑量之 物質/產物 強度 mcg	% w/w					
	1	5	25	100	250	1000
式(I)化合物	0.004	0.02	0.1	0.4	1	4
吸入用乳糖	99.996	99.98	99.9	99.6	99.0	96.0

表 15: 含有 0.5% 硬脂酸鎂之製劑

每劑量之 物質/產物 強度 mcg	% w/w					
	1	5	25	100	250	1000
式(I)化合物	0.004	0.02	0.1	0.4	1	4
硬脂酸鎂	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
吸入用乳糖	99.496	99.48	99.4	99.1	98.5	95.5

表 16: 含有 1% 硬脂酸鎂之製劑

每劑量之 物質/產物 強度 mcg	% w/w					
	1	5	25	100	250	1000
式(I)化合物	0.004	0.02	0.1	0.4	1	4
硬脂酸鎂	1	1	1	1	1	1
吸入用乳糖	98.996	98.98	98.9	98.6	98.0	95.0

【0199】 在整個說明書及隨後的申請專利範圍中，除非內文另有

所指，‘包括’，及變化如‘包含’及‘含有’之字，應瞭解意指包含所述整數，步驟，整數組或步驟組，但非排除任何其他整數，步驟，整數組或步驟組。

【0200】 本文中所指稱之所有專利案及專利申請案係整份合併於本文中作為參考。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

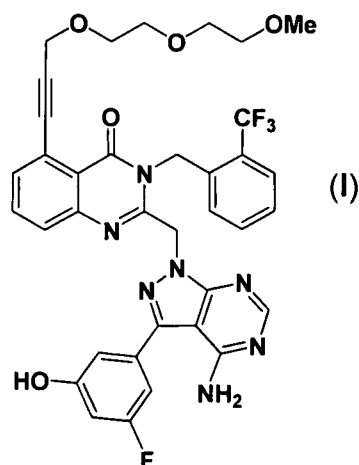
無

【序列表】 (請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

1. 一種式(I)化合物，



或其製藥上可接受之鹽，包括其所有立體異構物，互變異構體及同位素衍生物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之式(I)化合物，其係呈其型式 2 多晶型結晶之型式。
3. 如申請專利範圍第 1 項之式(I)化合物，其係呈其型式 3 多晶型結晶之型式。
4. 一種製藥組成物，其係包含如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物合併一種或多種製藥上可接受之稀釋劑或載體。
5. 如申請專利範圍第 4 項之製藥組成物，其進一步包含第二或其他活性組成份，如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑及 p38 MAP 激酶抑制劑。
6. 一種組合產物，其包含
 - (A) 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物；及
 - (B) 其他活性組成份，如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑，磷酸二酯酶抑制劑及 p38 MAP 激酶抑制

劑，

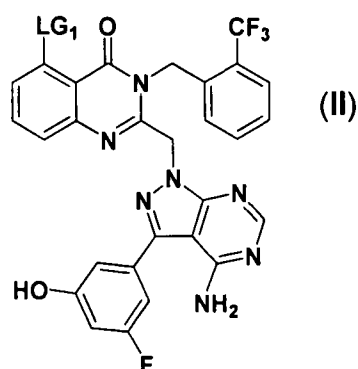
其中，各個組成份(A)及(B)係與製藥上可接受的稀釋劑或載體配製成摻合物。

7. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物，其係用作為醫藥品。
8. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物，其係用於與一種或多種如選自皮質類固醇， β 激動劑，黃嘌呤，毒蕈鹼拮抗劑及 p38 MAP 激酶抑制劑之其他活性組成份合併給藥之醫藥品中。
9. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物或如申請專利範圍第 4 項或申請專利範圍第 5 項之製藥組成物或如申請專利範圍第 6 項之組合產物，其用於治療或預防選自下列之狀況：COPD(包括慢性支氣管炎及肺氣腫)，氣喘，小兒氣喘，囊性纖維化，結節病，特發性肺纖維化，過敏性鼻炎，鼻炎，鼻竇炎，及同一狀況中任何一種由病毒引起的惡化，呼吸道病毒感染(包括其併發症)，過敏性結膜炎，結膜炎，過敏性皮膚炎，接觸性皮膚炎，牛皮癬，潰瘍性結腸炎，類風濕性關節炎或骨性關節炎之繼發性關節發炎，類風濕性關節炎，胰腺炎，惡病質，抑制腫瘤生長及轉移包括非小細胞肺癌，乳癌，胃癌，大腸癌及惡性黑色素瘤。
10. 一種如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物或如申請專利範圍第 4 項或申請專利範圍第 5 項之製藥製劑或如申請專利範圍第 6 項之組合產物於製備醫藥品以治療或預防選自下列狀況之用途：COPD (包括慢性支氣管炎及肺氣腫)，氣喘，小

兒氣喘，囊性纖維化，結節病，特發性肺纖維化，過敏性鼻炎，鼻炎，鼻竇炎及同一狀況中任何一種由病毒引起的惡化，呼吸道病毒感染(包括其併發症)，過敏性結膜炎，結膜炎，過敏性皮膚炎，接觸性皮膚炎，牛皮癬，潰瘍性結腸炎，類風濕性關節炎或骨性關節炎之繼發性關節發炎，類風濕性關節炎，胰腺炎，惡病質，抑制腫瘤生長及轉移，包括非小細胞肺癌，乳癌，胃癌，大腸癌及惡性黑色素瘤。

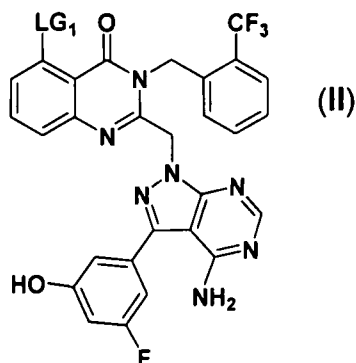
11. 一種治療選自包括下列之狀況的方法：COPD (包括慢性支氣管炎及肺氣腫)，氣喘，小兒氣喘，囊性纖維化，結節病，特發性肺纖維化，過敏性鼻炎，鼻炎，鼻竇炎，及同一狀況中任何一種由病毒引起的惡化，呼吸道病毒感染(包括其併發症)，過敏性結膜炎，結膜炎，過敏性皮膚炎，接觸性皮膚炎，牛皮癬，潰瘍性結腸炎，類風濕性關節炎或骨性關節炎之繼發性關節發炎，類風濕性關節炎，胰腺炎，惡病質，抑制腫瘤生長及轉移，包括非小細胞肺癌，乳癌，胃癌，大腸癌及惡性黑色素瘤，其包括將有效量之如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物，如申請專利範圍第 4 項或申請專利範圍第 5 項之製藥組成物或如申請專利範圍第 6 項之組合產物給藥至一個體。

12. 一種式(II)中間體：



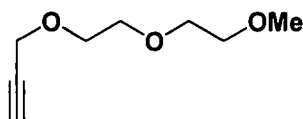
其中，LG₁ 代表一釋離基或其經保護之衍生物。

13. 一種製備如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之式(I)化合物的方法，其包括將式(II)化合物



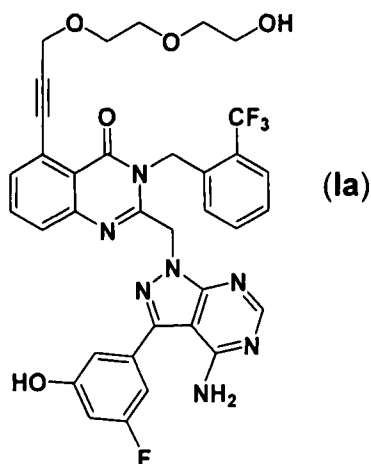
或其經保護之衍生物，

其中，LG₁ 代表一釋離基，與片段：



於適於提供式(I)化合物或其經保護之衍生物的條件下進行反應且，如需要時，將經保護之化合物去保護而得到式(I)化合物。

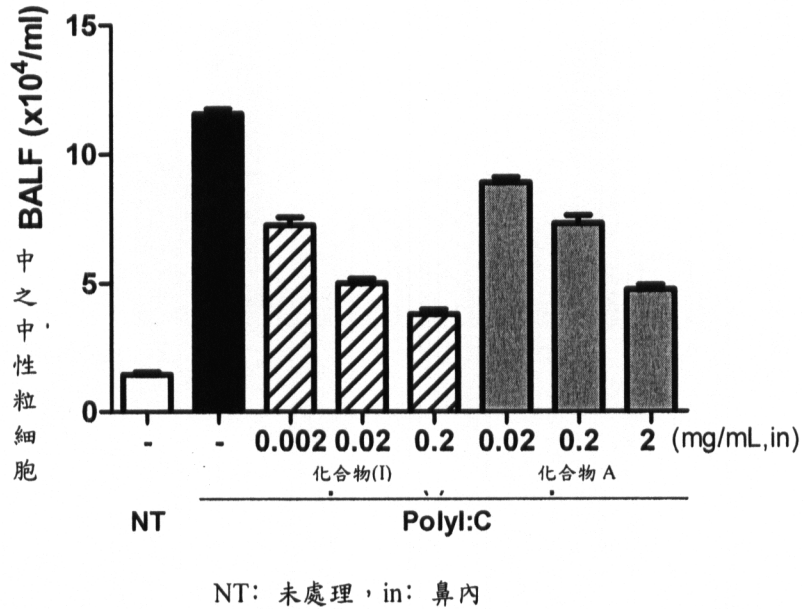
14. 一種式(Ia)化合物



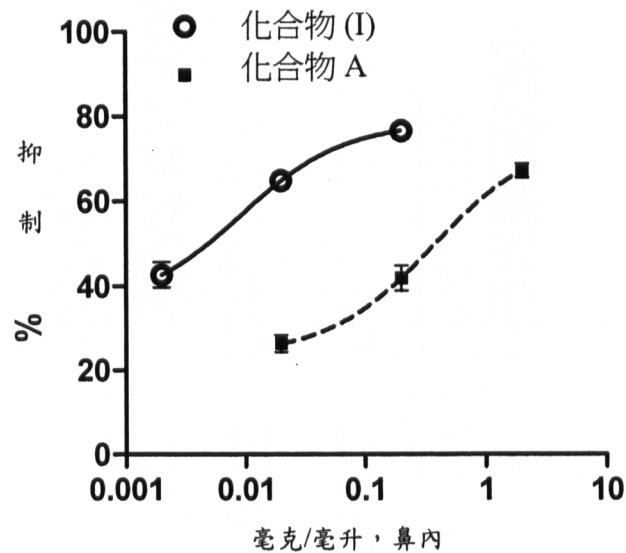
或其製藥上可接受之鹽，包括所有的立體異構物，互變異構體及其同位素衍生物。

圖式

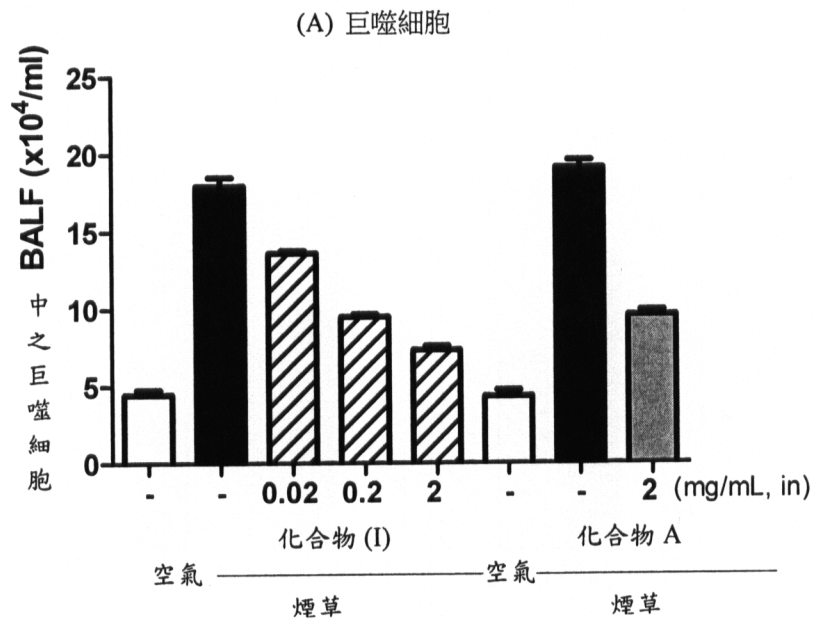
圖式 1a: 用化合物(I)或化合物 A 於老鼠呼吸道對於聚-I: C-誘發之中性粒細胞累積的治療功效



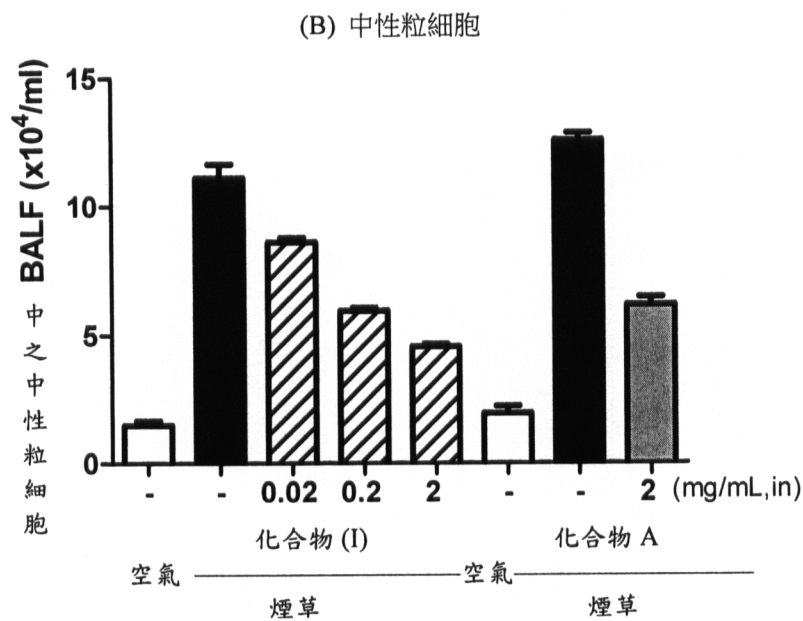
圖式 1b: 於小鼠呼吸道，化合物(I)與化合物 A 於聚-I: C-引起之中性粒細胞累積之抑制效價的比較



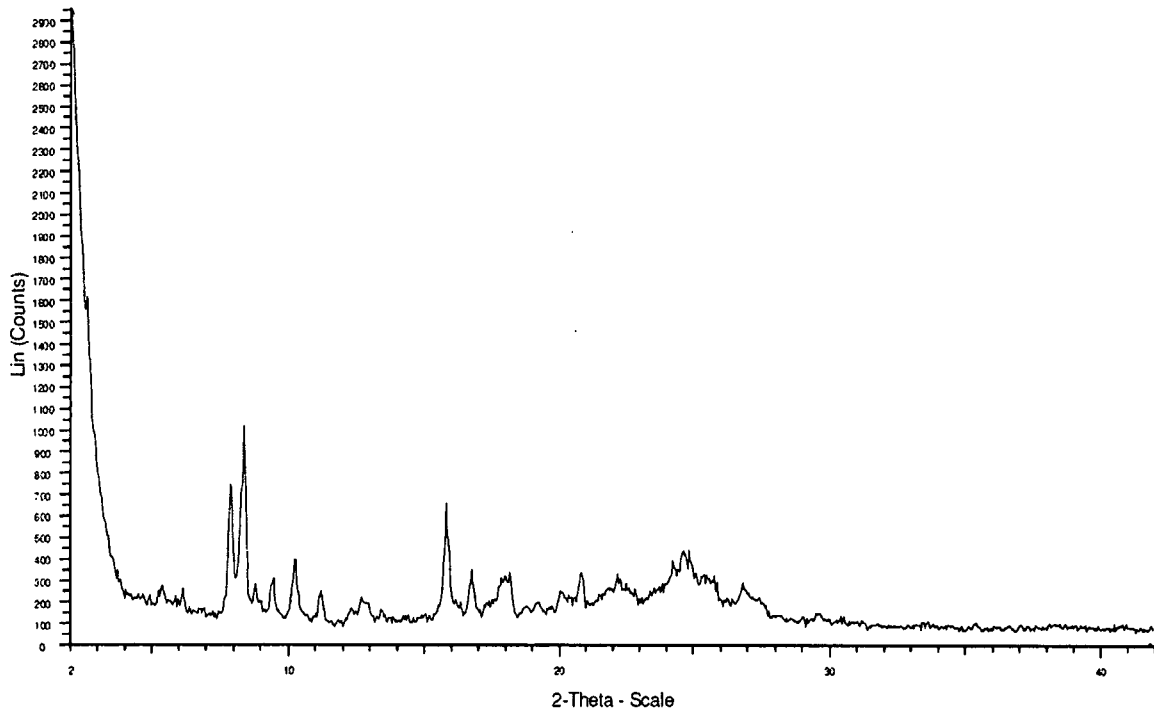
圖式 2a: 用化合物(I)或化合物 A 於小鼠 BALF 於香煙煙霧引起之巨噬細胞累積上的治療功效



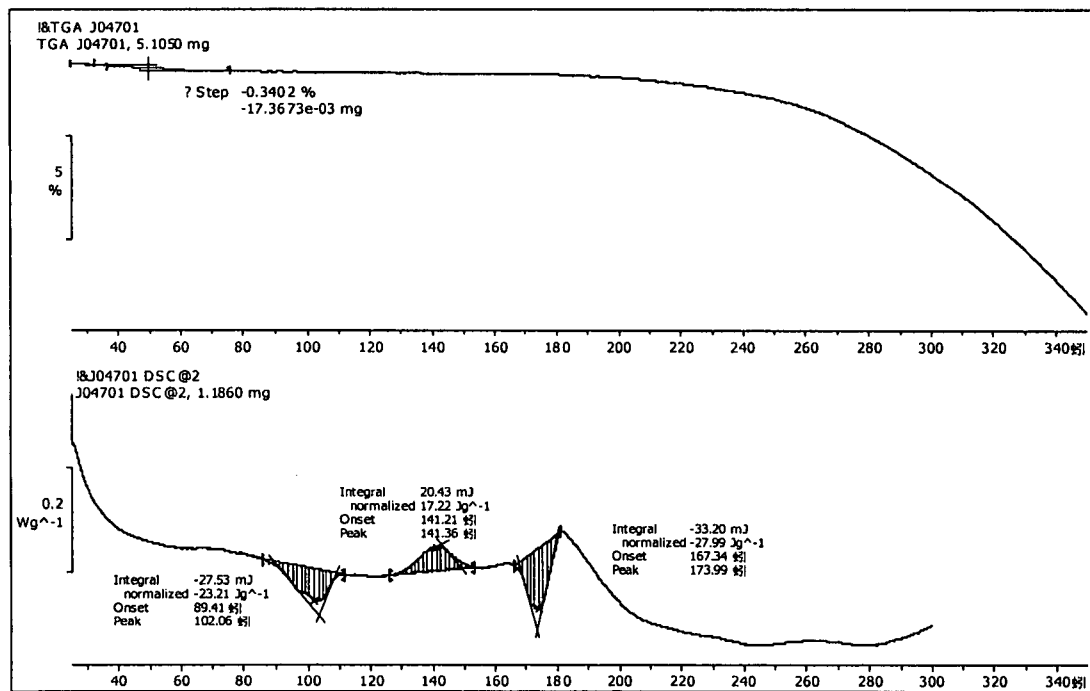
圖示 2b: 用化合物(I)或化合物 A 於小鼠 BALF 對於香煙煙霧引起之中性粒細胞累積上的治療功效



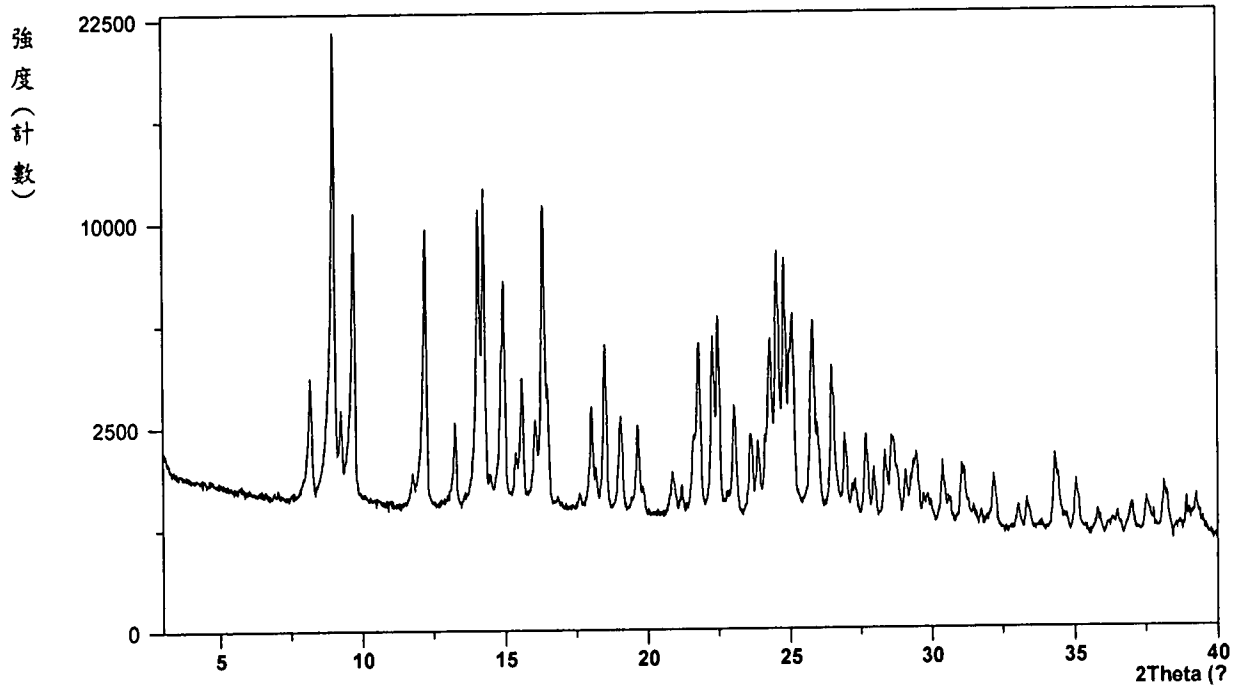
圖式 3



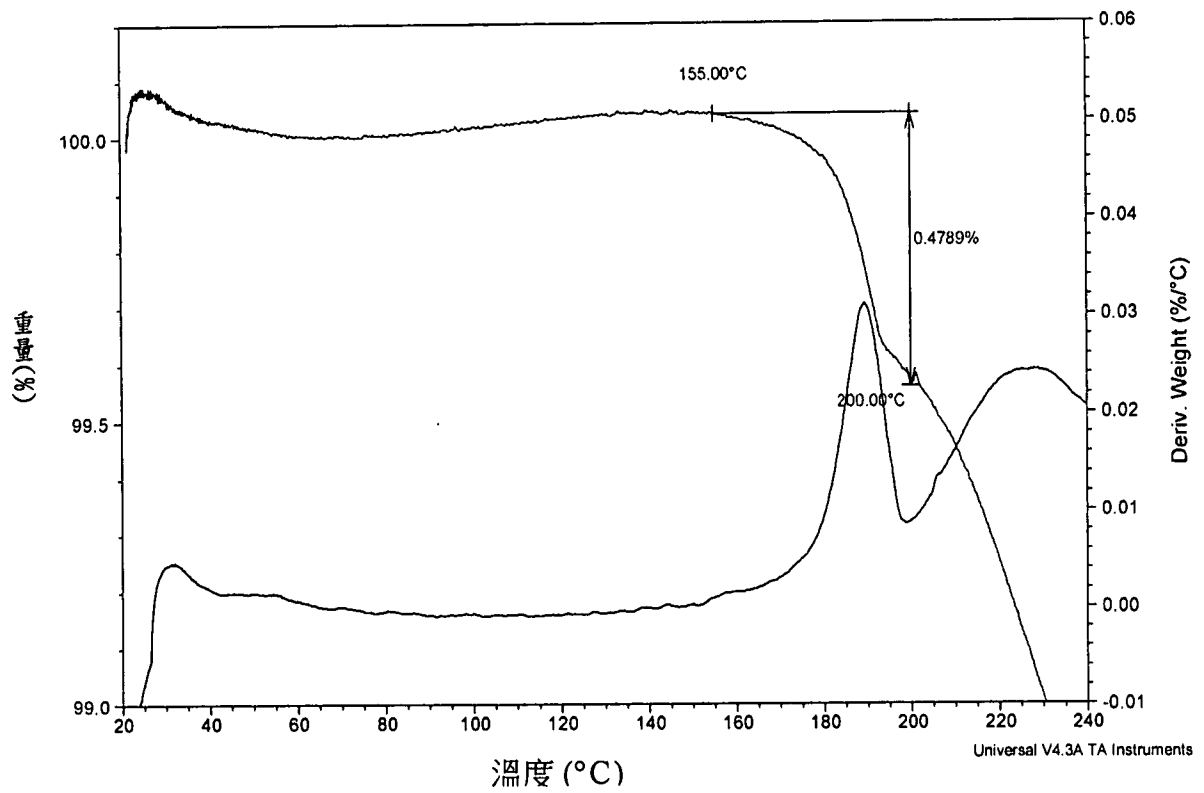
圖式 4



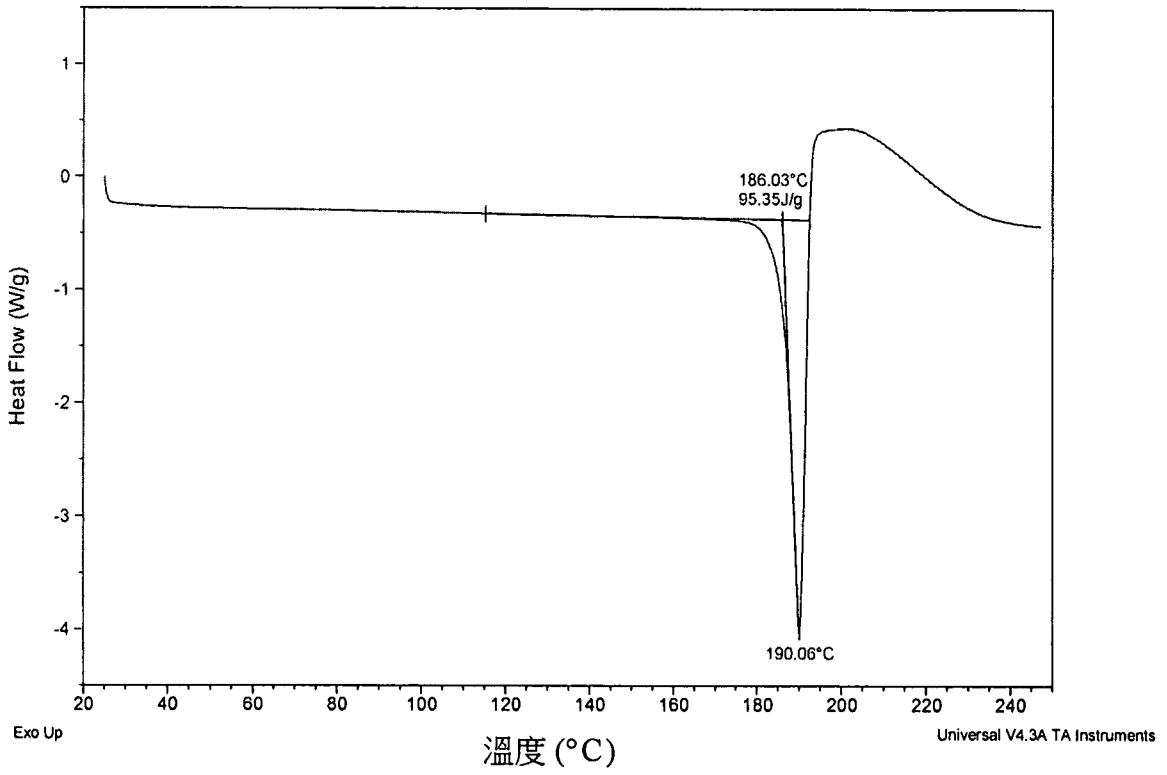
圖式 5



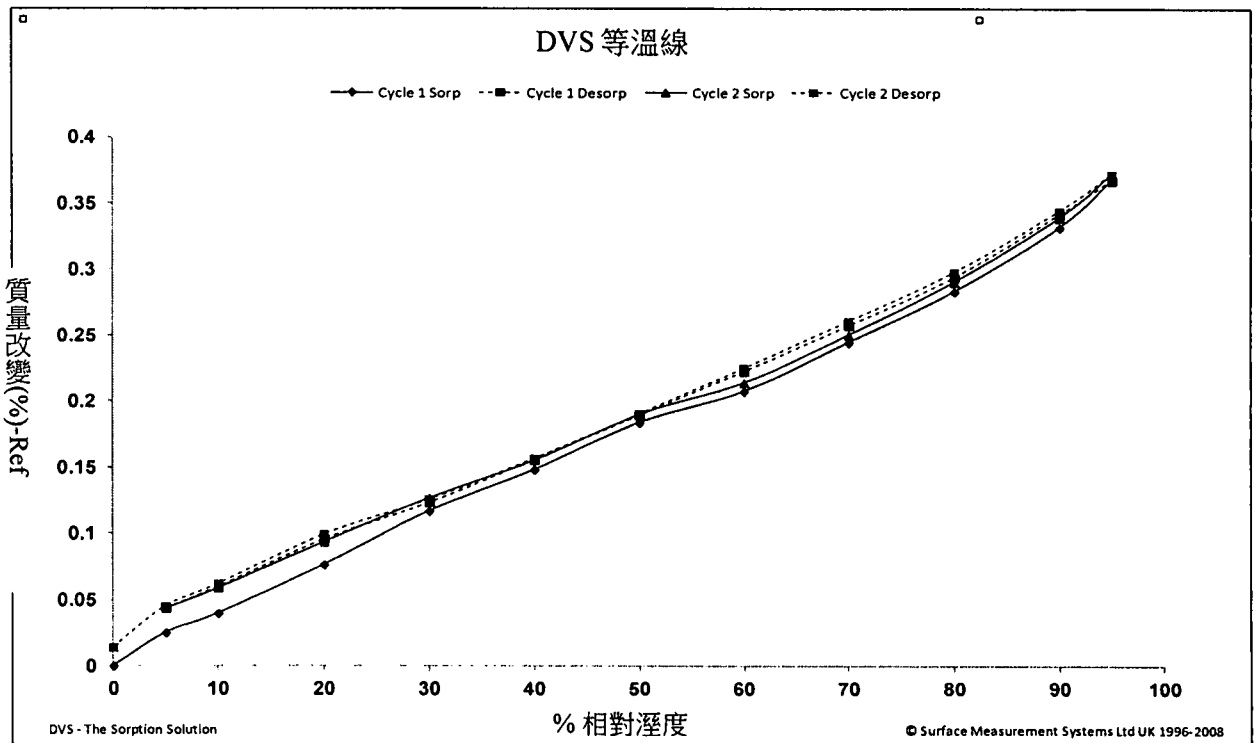
圖式 6



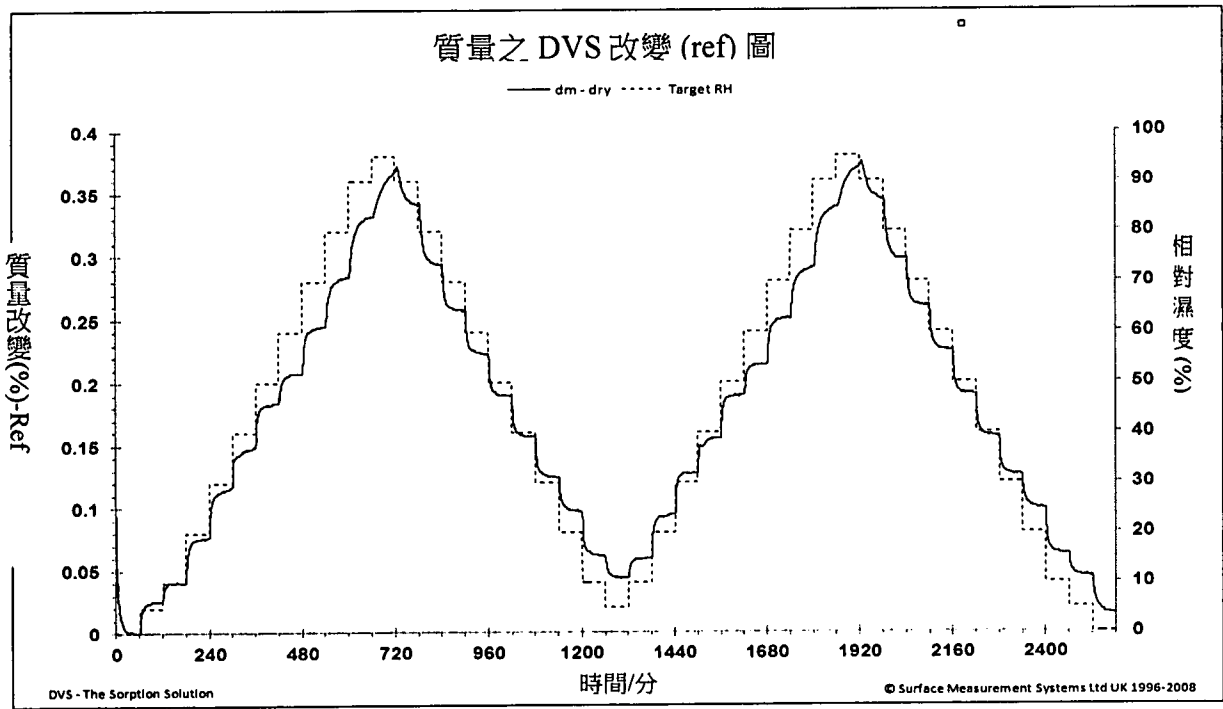
圖式 7



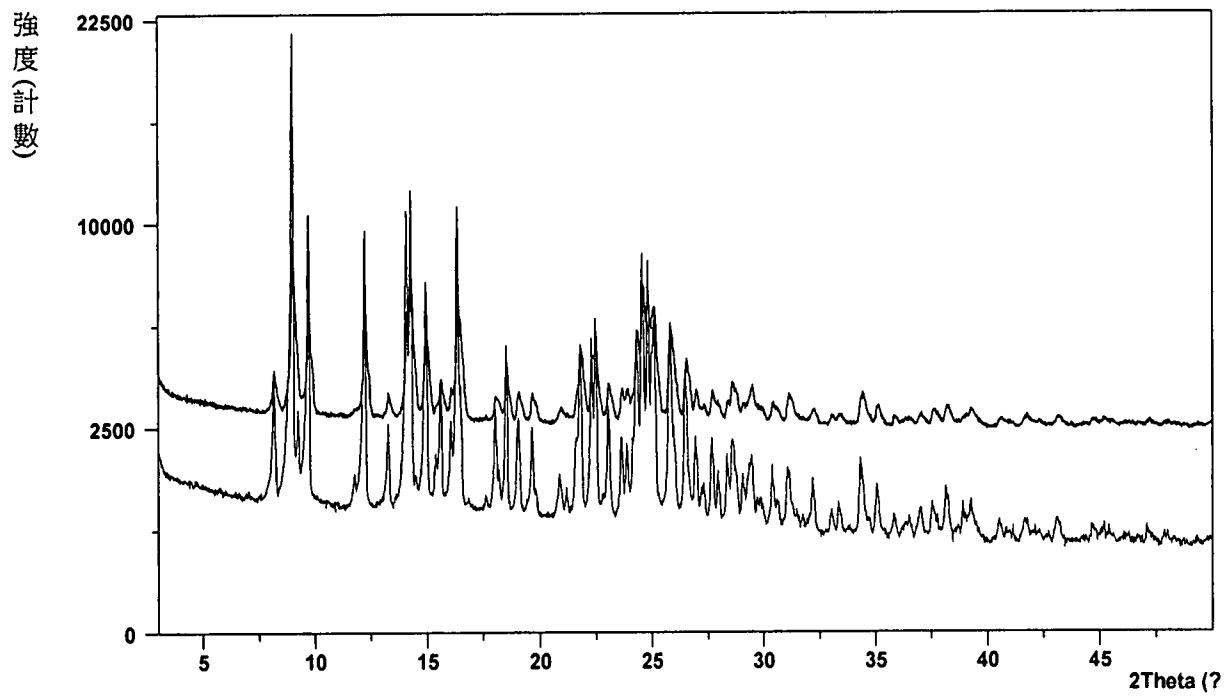
圖式 8



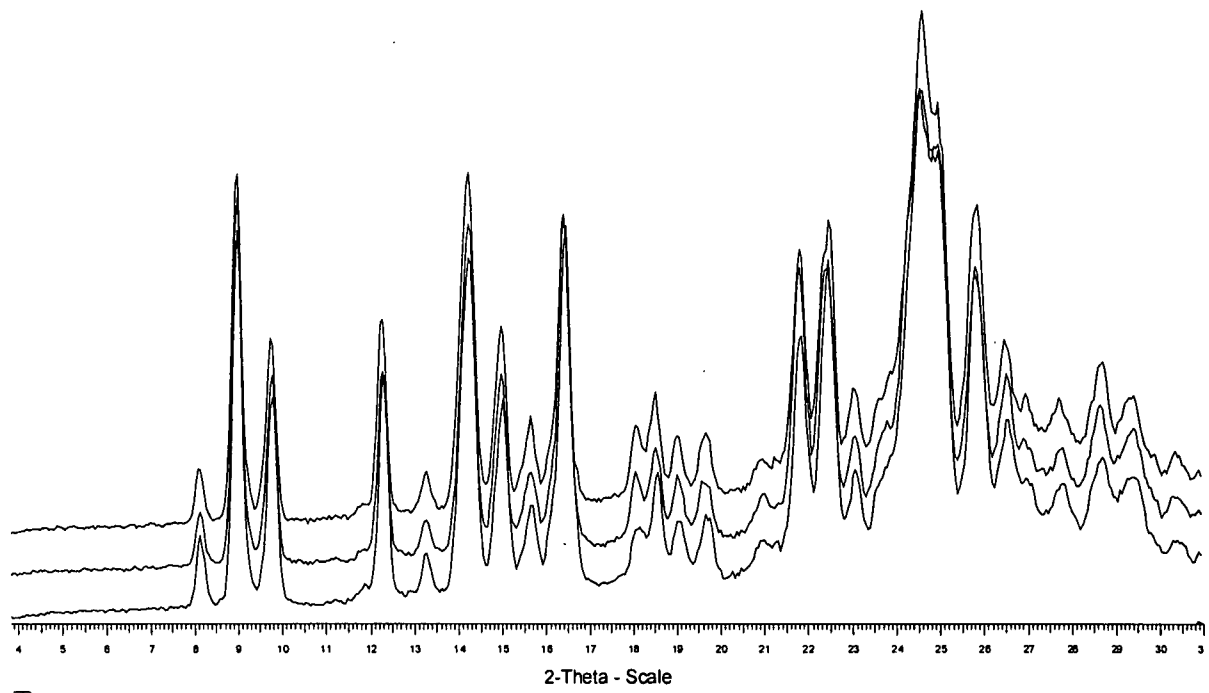
圖式 9



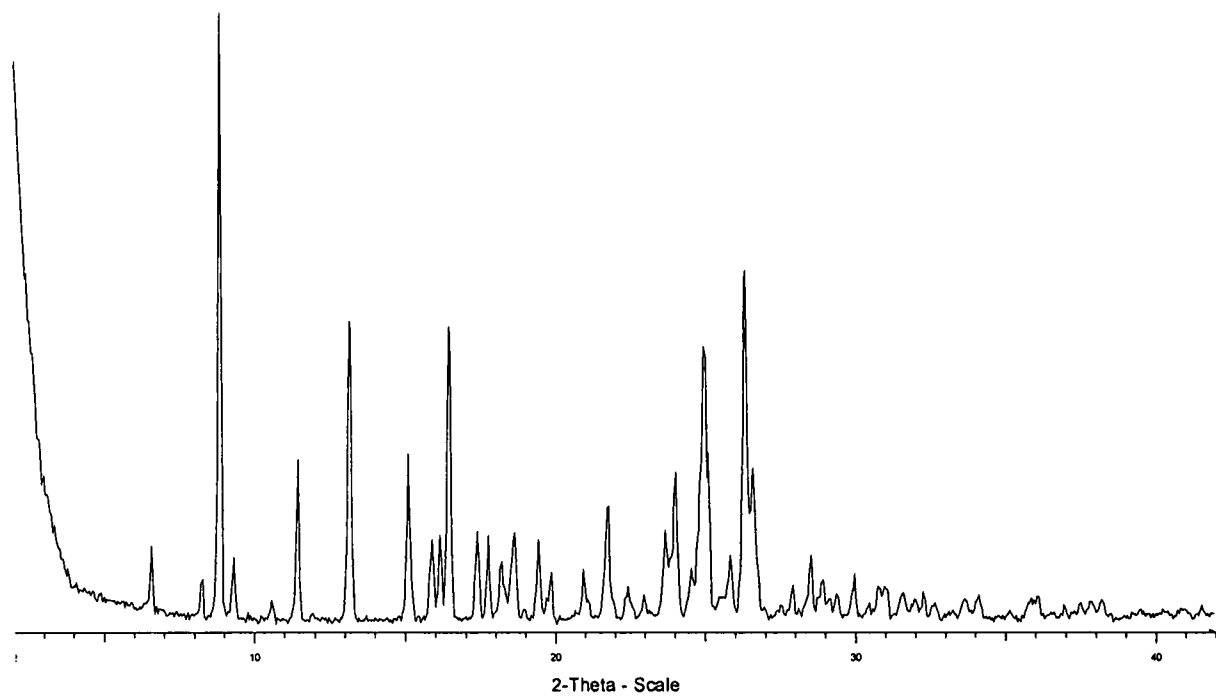
圖式 10



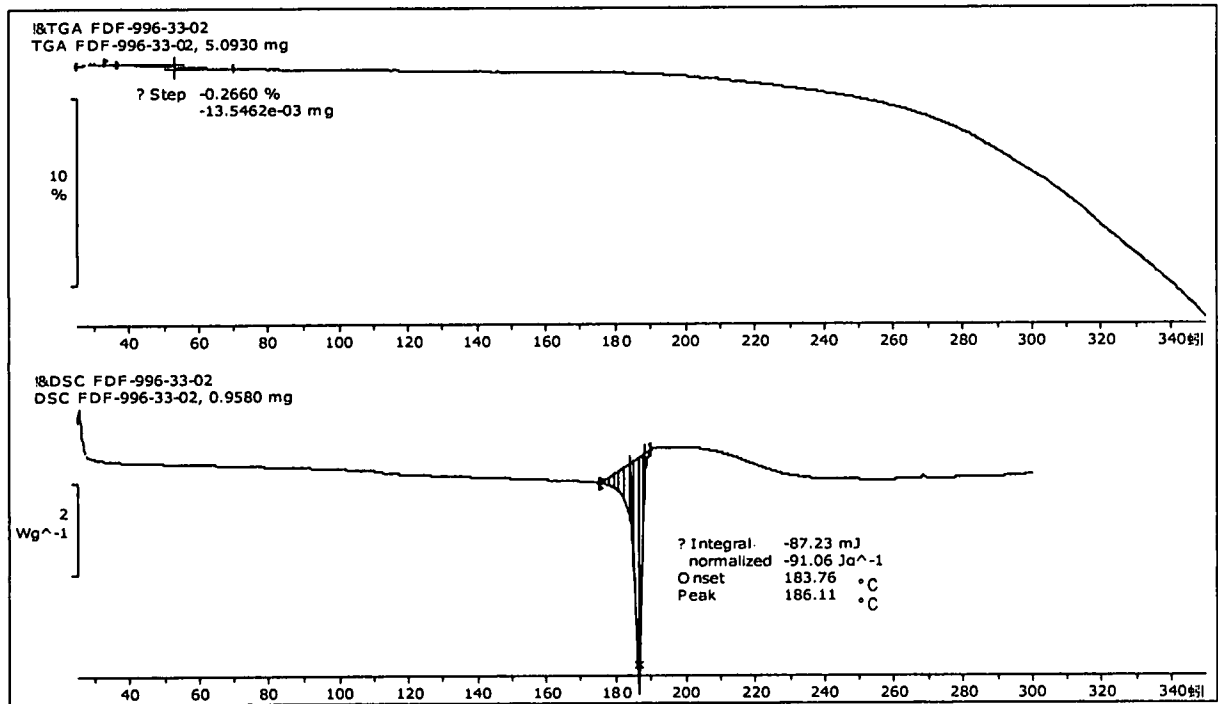
圖式 11



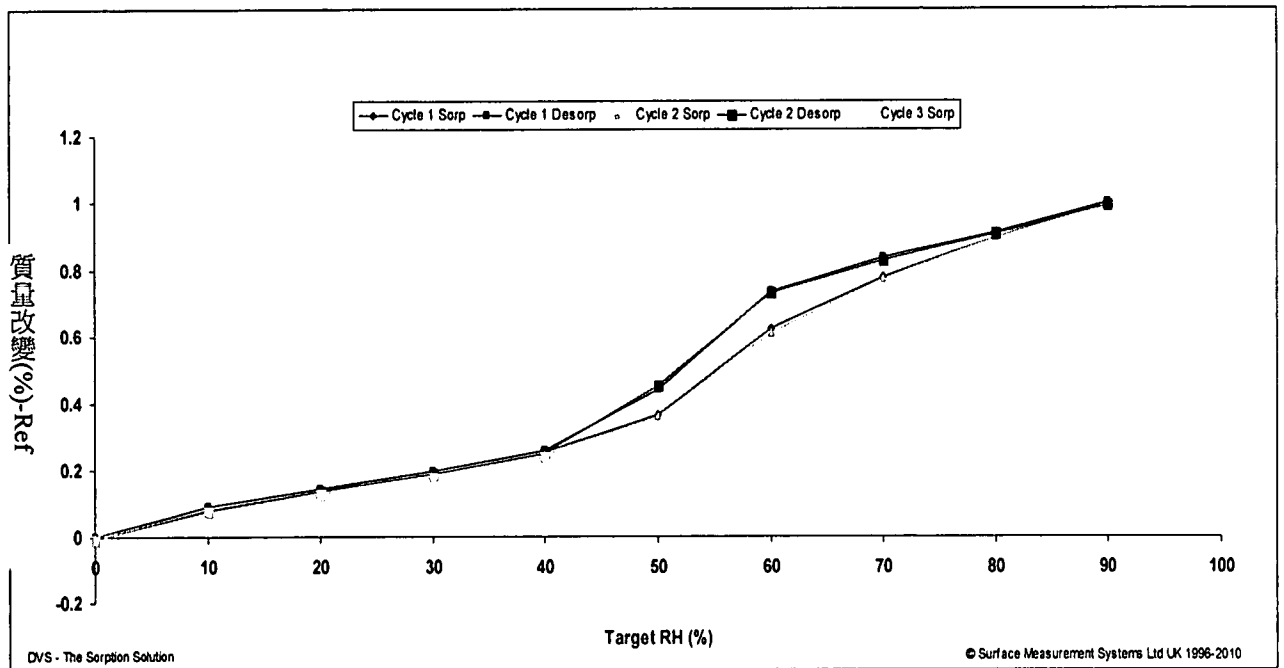
圖式 12



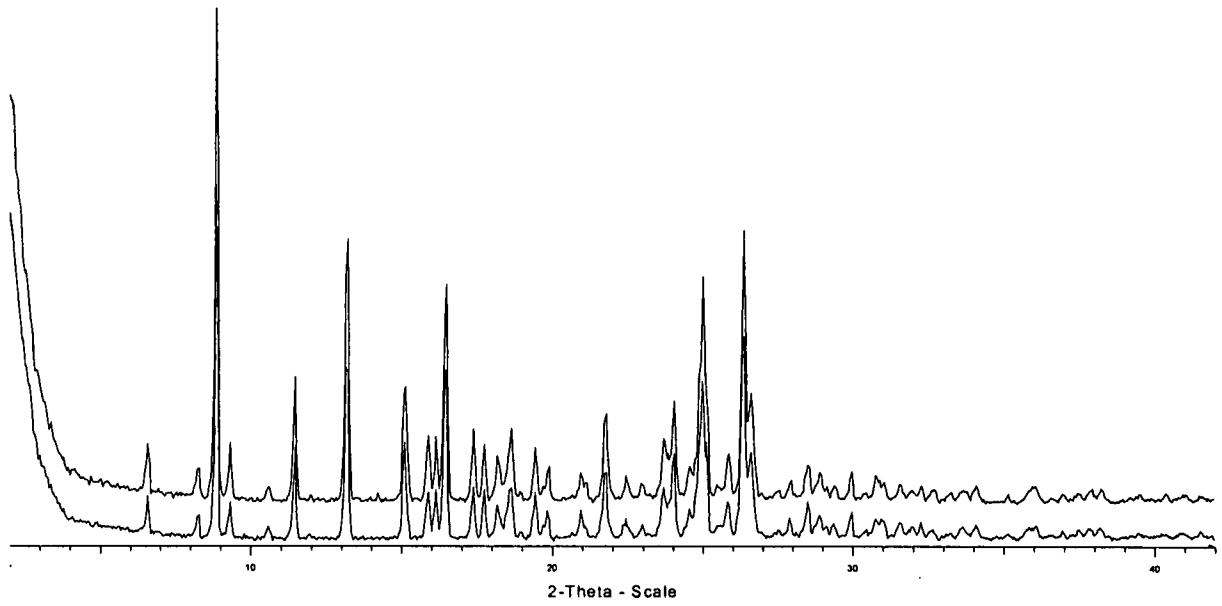
圖式 13



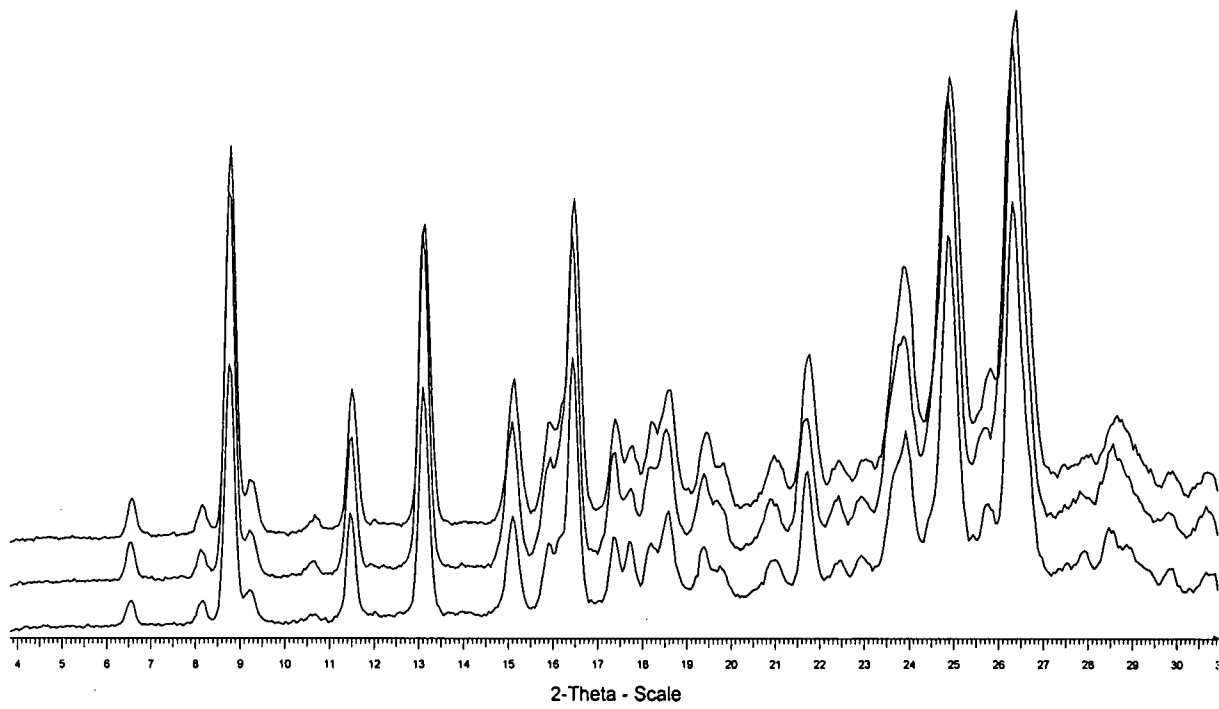
圖式 14



圖式 15



圖式 16



圖式 17

